

UNIVERSITE DE CORSE – PASCAL PAOLI
UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE CORSE
Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire

Présentée par
Thierry ALLARIO

**IDENTIFICATION DE DETERMINANTS PHYSIOLOGIQUES
ET MOLECULAIRES DE LA TOLERANCE A LA
CONTRAINTESALINE ET AU DEFICIT HYDRIQUE DE
PORTE-GREFFES AUTOTETRAPLOÏDES D'AGRUMES**

Soutenue le 23 Octobre 2009

Sous la direction du
Dr. Raphaël MORILLON

JURY :

M^{me}	Nathalie LEONHARDT	CEA de Cadarache, Rapporteur
M^r	Alain BOUCHEREAU	Université de Rennes I, Rapporteur
M^{me}	Liliane BERTI	Université de Corse, Examineur
M^r	Félix TOMI	Université de Corse, Examineur
M^r	José Manuel COLMENERO-FLORES	IRNASE, Examineur
M^r	Raphaël MORILLON	CIRAD, Examineur

REMERCIEMENTS

Cette thèse, financée par le projet Européen INCO CIBEWU, a été l'objet d'un partenariat étroit entre l'INRA de Corse (France), l'IVIA de Valence (Espagne) et le CIRAD (France). Je remercie par conséquent chaque institut pour leur accueil et leur contribution à ce travail en adressant toute ma reconnaissance à leurs directeurs respectifs : M^{me} **Agostini Dominique**, présidente INRA-Centre Corse, M^r **Pailly Olivier** et M^r **Urban Laurent**, directeurs UR GEQA à l'INRA de San Giuliano ; M^r **Juste Florentino**, directeur de l'IVIA ; M^r **Domaingue Robert**, directeur de l'unité de recherche « Amélioration génétique d'espèces à multiplication végétative » du CIRAD, et M^r **Ollitrault Patrick**, coordinateur du projet Européen INCO CIBEWU et docteur au CIRAD.

Ce travail a été réalisé grâce au concours de nombreuses personnes auxquelles je tiens à rendre hommage. Ainsi, je remercie :

- M^r **Morillon Raphaël**, directeur de cette thèse et docteur au CIRAD, pour sa confiance et sa disponibilité tout au long de ce travail. Je le remercie également pour l'intérêt et le suivi assidu dont il a fait preuve. Au-delà de ses enseignements, je retiendrais son engagement personnel sur ce travail qui nous a valu de nombreux débats sur de multiples questions de recherche. Je l'invite à prolonger ces débats bien au-delà de ce travail de thèse, si cette envie lui tient à cœur autant qu'à moi-même.

- M^r **Ollitrault Patrick**, coordinateur du projet Européen INCO CIBEWU et docteur au CIRAD, pour sa confiance et son estimable participation sur les questions de recherche. Je tiens également à lui exprimer mes remerciements pour avoir facilité mon travail au sein des équipes de recherche de l'IVIA.

- M^r **Talon Manuel**, directeur du centre de génomique de l'IVIA, et M^r **Navarro Luis**, directeur du centre de protection végétale et de biotechnologie de l'IVIA, pour leur accueil au sein de leurs équipes de recherches respectives.

•M^r **Colmenero-Flores José-Manuel**, alias Chema, docteur à l'IRNAS, pour sa participation à ce travail, notamment sur l'étude de l'expression génique par microarrays. Un grand merci pour sa patience, sa disponibilité et son enseignement.

•M^r **Tadeo Francisco**, alias Quico, docteur à l'IVIA, pour sa contribution à cette étude, particulièrement pour son implication sur l'étude des coupes histologiques des tissus végétaux autotétraploïdes et diploïdes. Un grand merci, également, pour sa chaleur humaine et sa bonne humeur communicative.

•M^r **Iglesias Domingo**, docteur à l'IVIA, pour sa collaboration et ses conseils sur la mise en place des dispositifs expérimentaux en serre.

•M^r **Brumos Javier**, alias Javi, thésard à l'IVIA sous la direction du docteur Colmenero-Flores, pour m'avoir transmis son savoir faire sur la réalisation des techniques de microarrays et de RT-PCR en temps réel. Je lui suis redevable du soutien, de l'assistance et de la sympathie dont il m'a témoigné à tout instant.

•M^{me} **Jaffuel Sylvie**, docteur au CIRAD, et M^r **Urban Laurent**, directeur UR GEQA à l'INRA de San Giuliano, pour leurs conseils et leurs contributions sur la mise en place des dispositifs expérimentaux et sur le traitement des données physiologiques obtenus.

•M^r **Luro François**, docteur à l'INRA, M^r **Costantino Gilles**, docteur à l'INRA, et M^r **Froelicher Yann**, docteur au CIRAD, pour leur assistance et leur disponibilité.

Merci :

•A tous ceux qui ont apporté leur pierre à cet édifice, aux premiers rangs desquels je cite : **Franciulino Anne-Laure** (INRA), **Ribouchon Jean-Luc** (INRA), **Carcouët Elodie** (INRA), **Curk Franck** (INRA), **Talon Isabella** (IVIA), **Pina Antonio** (IVIA), **Hussain Sajjad**, **Bassène Jean-Baptiste**, **Andrès Fernando**.

•Mais aussi plus largement, Bouffin Jean, Varamo François, Merelo Paz, Naranjo Miguel-Angel, Domingo Concha, Terol Javier, Hagère, Nehza, Rhym, Méral, Bruno, Alexandra,

Teiki, Vahima, Hervé, Séverine, Marilyne, Charles, Roselyne, Angel, Isabella, Nuria, Elena, Christina, Victoria, Amparo, Carmen, Gamino, Alicia, Nati.

•Et à tous ceux qui de près ou de loin ont apporté un soutien à ce travail.

•Enfin, je remercie le jury, soit M^{me} **Leonhardt Nathalie**, docteur au CEA de Cadarache, M^r **Bouchereau Alain**, professeur à l'Université de Rennes I, M^{me} **Berti Liliane**, professeur à l'Université de Corse, M^r **Tomi Félix**, professeur à l'Université de Corse, M^r **Colmenero-Flores José-Manuel**, docteur à l'IRNAS et M^r **Morillon Raphaël**, docteur au CIRAD d'avoir accepté de consacrer de leur temps dans l'évaluation de ce travail.

A Victor...

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	15
1.1. LA DESERTIFICATION : UNE MENACE CROISSANTE	15
1.1.1. Le réchauffement climatique.....	15
1.1.2. Une pression croissante sur les réserves d'eau	16
1.1.3. La dégradation des sols.....	17
1.1.4. La lutte contre la désertification	19
1.2. LA SALINITE DES SOLS : ORIGINES ET CONSEQUENCES....	20
1.2.1. Les sols salins	20
1.2.2. Origines de la contamination des sols par les sels	22
1.2.3. Contamination des eaux d'irrigation : l'exemple de la communauté Valencienne (Espagne).....	23
1.2.4. Impact de la contrainte saline sur les cultures	27
1.3. L'EAU ET LES PLANTES.....	30
1.3.1. Les mouvements d'eau entre l'intérieur et l'extérieur des cellules	30
• <i>Diffusion de l'eau, flux de masse et osmose</i>	30
• <i>Le potentiel hydrique</i>	30
• <i>Implication des aquaporines</i>	32
1.3.2. Les mouvements de l'eau chez la plante : la balance hydrique	32
• <i>L'eau dans le sol</i>	32
• <i>La transpiration et la feuille</i>	34
• <i>Transport de l'eau de la racine à la feuille</i>	37
• <i>L'absorption de l'eau par la racine</i>	39
• <i>Le continuum sol-plante-atmosphère</i>	40
1.4. LE DEFICIT HYDRIQUE CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES	41
1.4.1. Les différentes stratégies de résistance à la sécheresse	41
• <i>Stimulation de la croissance racinaire</i>	41
• <i>Réduction de la surface foliaire et accroissement de la cuticule</i>	42
• <i>Fermeture stomatique : implication de l'acide abscissique (ABA)</i>	42
- <i>Voie de biosynthèse de l'ABA</i>	43
- <i>Transport de l'ABA par le système vasculaire</i>	45
- <i>Rôle de l'ABA dans la signalisation du stress de la racine vers la feuille</i>	45
- <i>L'ABA et la fermeture stomatique</i>	47
• <i>Régulation des gènes impliqués dans la tolérance au déficit hydrique : les voies dépendantes et indépendantes de l'acide abscissique</i>	48
1.4.2. Maintien de la balance hydrique par ajustement osmotique	50
• <i>L'ajustement osmotique des cellules</i>	50
• <i>Modification de l'expression génique induite par stress osmotique</i>	51
1.4.3. Le stress thermique, conséquence du stress hydrique	53
• <i>Altération de la dissipation de l'énergie au niveau des feuilles</i>	53
• <i>Vulnérabilité de la photosynthèse aux fortes températures</i>	53
• <i>Modification de la stabilité membranaire sous haute température</i>	56
• <i>Synthèse de protéines protectrices</i>	56
1.5. LE STRESS SALIN CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES	58
1.5.1. Diversité adaptative des plantes à un environnement salin	58
1.5.2. Les effets nocifs du stress salin.....	59

• Une similarité avec le déficit hydrique : le stress osmotique	59
• La toxicité ionique	59
1.5.3. Les stratégies d'acclimatation au stress salin	60
1.5.4. Exclusion et compartimentation des ions toxiques	62
1.6. LES AGRUMES.....	65
1.6.1. Taxonomie.....	65
1.6.2. Histoire et Economie	66
1.6.3. Les porte-greffes.....	68
• Le Bigaradier (<i>Citrus aurantium</i>)	68
• Le mandarinier Cléopâtre (<i>Citrus reticula blanco</i>)	69
• Le Poncirus trifoliata (<i>Poncirus trifoliata</i>)	69
• Le citrumelo Swingle (<i>Citrus paradisi x Poncirus trifoliata</i>)	69
• Le citrange Carrizo (<i>Citrus sinensis x Poncirus trifoliata</i>)	70
• La lime Rangpur (<i>Citrus limonia Osbeck</i>).....	70
1.3.4. La création variétale	70
1.7. LA POLYPLOIDIE.....	72
1.7.1. Qu'est ce qu'un plant polyploïde ?	72
• Un autopolyploïde ?	72
• Un allopolyploïde ?	73
1.7.2. Morphologie d'un plant tétraploïde	74
1.7.3. Régulation épigénétique.....	75
• La paramutation.....	76
• Le « bookmarking »	76
• L' « imprinting »	76
• Le « silencing »	77
1.7.4. Régulation épigénétique chez les polyploïdes	78
• Chez les allopolyploïdes	78
• Chez les autopolyploïdes	79
2. OBJECTIFS.....	81
2.1. LE PROJET I.N.C.O. (Specific International Scientific Cooperation Activities) C.I.B.E.W.U. (Citrus Breeding for Efficient Water and Nutrient Use)	81
2.1.1. Les enjeux de l'agrumiculture Méditerranéenne.....	81
2.1.2. Les objectifs du projet INCO CIBEWU	82
2.2. LES OBJECTIFS DU WP N°5.....	82
2.3. LES OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	83
3. MATERIELS ET METHODES	85
3.1. MATERIEL VEGETAL	85
3.2. MESURES PHYSIOLOGIQUES	90
3.2.1. Rendement quantique et rendement quantique maximum du PSII	90
• Principe	90
• Rendement quantique du PSII (Φ_{PSII})	90
• Rendement quantique maximal du PSII (F_v/F_m)	90
3.2.2. Taux de chlorophylle.....	91
3.2.3. Conductance stomatique.....	91
3.2.4. Evaluation de la perte hydrique.....	91
3.2.5. Mesures anatomiques.....	92
• Surface et densité stomatique	92

• <i>Epaisseur foliaire</i>	92
• <i>Taille des plants</i>	92
3.3. CYTOMETRIE EN FLUX	92
3.4. DOSAGES IONIQUES	92
3.4.1. Méthode par minéralisation (Exp.1)	92
• <i>Préparation des échantillons</i>	92
• <i>Mesure des chlorures</i>	93
• <i>Mesure des Sodiums</i>	93
3.4.2. Méthode par chromatographe ionique (Exp.2)	93
3.5. DOSAGE DE L'ACIDE ABSCISSIQUE (test ELISA)	93
3.5.1. Principe	93
3.5.2. Méthodologie.....	94
• <i>Préparation des échantillons</i>	94
• <i>Test ELISA</i>	94
3.6. EXTRACTION ARN.....	95
3.7. PUCES A ADN.....	96
3.7.1. Principe	96
3.7.2. Méthodologie.....	97
• <i>Préparation des échantillons</i>	97
• <i>Préparation des puces à ADN et hybridation</i>	98
• <i>Lavages et imagerie</i>	99
3.8. P.C.R. EN TEMPS REEL	99
3.8.1. Principe	100
3.8.2. Méthodologie.....	101
• <i>Préparation des échantillons</i>	101
• <i>Définition des couples d'amorces</i>	101
• <i>Elaboration des courbes étalons</i>	103
• <i>Quantification relative par RT-PCR en temps réel</i>	104
3.9. COUPE HISTOLOGIQUE DE TISSUS VEGETAUX	105
3.9.1. Principe	105
3.9.2. Méthodologie.....	105
• <i>Echantillonnage</i>	105
• <i>Inclusion et coupe transversale</i>	105
• <i>Préparation des lames et observations</i>	106
4. RESULTATS ET DISCUSSION	107
4.1. ARTICLE 1 : LES PORTE-GREFFES AUTOTETRAPLOIDES D'AGRUMES SONT PLUS TOLERANT AU STRESS SALIN QUE LES DIPLOIDES.....	107
4.2. ARTICLE 2 : EN FORTE CONTRAINTE SALINE ET SANS MANQUE D'EAU, LES PLANTULES D'AGRUMES TETRAPLOIDES SONT PLUS SENSIBLES QUE LES DIPLOIDES	117
4.3. ETUDE DU COMPORTEMENT PHYSIOLOGIQUE DES PORTE-GREFFES TETRAPLOIDES ET DIPLOIDES FACE AU STRESS SALIN	148
4.3.1. Les porte-greffes FLHORAG1 allotétraploïdes et <i>Poncirus trifoliata</i> autotétraploïdes et diploïdes greffés avec le clémentinier commun ou le cédratier Etrog	148

4.3.2. Les porte-greffes Citrange carrizo autotétraploïdes et diploïdes greffés avec le clémentinier commun ou le cédratier Etrog	153
4.4. ARTICLE 3 : LES DIFFERENCES MORPHOLOGIQUES ET ANATOMIQUES OBSERVEES ENTRE LA LIME RANGPUR (<i>CITRUS LIMONIA</i>) DIPLOIDE ET AUTOTETRAPLOIDE SONT ASSOCIEES Á DE FAIBLES MODIFICATIONS D'EXPRESSION GENIQUE AU NIVEAU DES FEUILLES	160
4.5. ARTICLE 4 : L'UTILISATION DE LA LIME RANGPUR (<i>CITRUS LIMONIA</i>, OSBECK) AUTOTETRAPLOIDE COMME PORTE-GREFFE AMELIORE LA TOLERANCE AU DEFICIT HYDRIQUE DU CEDRATIER (<i>CITRUS MEDICA</i>)	191
4.6. ARTICLE 5 : LA PLUS GRANDE TOLERANCE AU DEFICIT HYDRIQUE DE L'ORANGER VALENCIA DELTA (<i>CITRUS SINENSIS</i>) GREFFE SUR LA LIME RANGPUR (<i>CITRUS LIMONIA</i>) AUTOTETRAPLOIDE EST MEDIEE PAR UNE SUR-EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA TOLERANCE AU DEFICIT HYDRIQUE AU NIVEAU DE LA RACINE.....	217
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	250
5.1. LES PORTE-GREFFES AUTOTETRAPLOIDES D'AGRUMES ET LE STRESS SALIN	250
5.1.1. Le stress salin et les variétés francs de pieds	250
5.1.2. Le greffage sur plants autotétraploïdes.....	251
5.2. LA LIME RANGPUR AUTOTETRAPLOIDE ET LE DEFICIT HYDRIQUE.....	252
5.2.1. L'autotétraploïdie et la tolérance au déficit hydrique	252
• <i>Les modifications génétiques et phénotypiques</i>	252
• <i>L'ABA</i>	253
• <i>Le maintien de l'intégrité cellulaire</i>	254
• <i>Les phytohormones</i>	255
• <i>Le tréhalose</i>	255
5.2.2. Modification du comportement physiologique de la variété greffée sur porte-greffe autotétraploïde.....	256
• <i>Réduction de la conductance stomatique</i>	256
• <i>Réduction de la production et maintien de la qualité des fruits</i>	258
• <i>Les porte-greffes d'agrumes autotétraploïdes et le déficit hydrique</i>	259
5.3. ESSAIS AU CHAMP DE PORTE-GREFFES D'AGRUMES TETRAPLOIDES	259
6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	260

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution des anomalies globales des températures des terres et océans relevées de 1880 à nos jours (source : NASA (2006)).	15
Figure 2 : Evolution démographique de la population mondiale de -10000 ans à l'an 2000 (sources : US Census Bureau ; ONU (2008)).	17
Figure 3 : Part de la superficie cultivée irriguée : superficie équipée pour l'irrigation en pourcentage de la superficie cultivée en 2003 (source : FAO-AQUASAT (2008)).	21
Figure 4 : Part d'eau prélevée par l'agriculture : prélèvement de l'eau par l'agriculture en pourcentage du prélèvement total d'eau pour les usages agricoles, domestiques et industriels en 2001 (source : FAO-AQUASAT (2008)).	21
Figure 5 : Modifications physiologiques induits par un déficit hydrique (Hsiao, 1979).	31
Figure 6 : Coupe schématique d'une racine et des voies de cheminement de l'eau du milieu extérieur aux tissus vasculaires de la racine: la voie apoplastique, la voie symplastique et la voie transmembranaire.	38
Figure 7 : Voie de biosynthèse des caroténoïdes conduisant à la synthèse d'acide abscissique.	44
Figure 8 : Redistribution de l'acide abscissique chez la feuille suite à l'alcalinisation de la sève xylémique lors d'un stress hydrique.	46
Figure 9 : Voies de signalisation du stress osmotique chez la cellule végétale : la voie ABA-dépendante et la voie ABA-indépendante (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2000).	50
Figure 10 : Régulation de l'homéostasie ionique par la voie SOS-dépendante (Zhu, 2002).	63
Figure 11 : Taxonomie des <i>Aurantioideae</i> (Swingle et Reece, 1967).	65
Figure 12 : L'allopolypléidie naturelle (Chen, 2007).	74
Figure 13 : Résultat d'hybridation sur puce ADNc 20K Citrus.	99
Figure 14 : Evolution de la fluorescence chlorophyllienne et de la concentration foliaire en chlorure exprimée au cours du stress.	151
Figure 15 : Mesure de la concentration foliaire et racinaire en sodium et en chlorure, du niveau d'hydratation des feuilles, et de la distribution entre feuille et racine des ions Na ⁺ et Cl ⁻ pour chaque génotype au dernier jour de l'expérience.	152
Figure 16 : Evolution de la fluorescence chlorophyllienne et de la concentration foliaire en chlorure au cours du stress. (D: Citrange carrizo, E: cédratier/Citrange carrizo, et F: clémentinier SRA92/Citrange carrizo).	156

Figure 17 : Mesure de la concentration foliaire et racinaire en sodium et en chlorure et du niveau d'hydratation des feuilles pour chaque génotype au dernier jour de l'expérience. 157

Figure 18 : Mesure du champ quantique du PSII, de la conductance stomatique, de la perte hydrique, du taux de chlorophylle et de la chute foliaire du cédratier greffé sur Citrange carrizo diploïde et autotétraploïde au cours du stress salin..... 158

Figure 19 : Mesure du statut hydrique des feuilles, de la concentration foliaire en chlorure et du potentiel hydrique foliaire au dernier jour de l'expérience entre plants témoins et stressés greffés sur Citrange carrizo diploïde et autotétraploïde 159

ARTICLE 1

Figure 1 : Growth rate of two salt sensitive and salt tolerant diploid and tetraploid rootstocks112

Figure 2 : Pictures of diploid and tetraploid Cleopatra mandarin grown in control and salt stress conditions for 47 days113

Figure 3 : Number of leaves of diploid and tetraploid plants after 47 days of growth in control and salt stress conditions114

Figure 4 : Sodium and chloride content of leaves and roots from diploid and tetraploid plants114

ARTICLE 2

Figure 1 : Maximum quantum yield of the photosystem II $[(F_m - F_0)/F_m]$ measured along 8 weeks of salt stress on diploid and autotetraploid plants of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and on the allotetraploid FLHORAG1141

Figure 2 : Leaf sodium contents measured after 8 weeks of salt stress from diploid and autotetraploid plants of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and on the allotetraploid FLHORAG1142

Figure 3 : Root chloride and sodium contents measured after 8 weeks of salt stress from diploid and autotetraploid plants of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and on the allotetraploid FLHORAG1143

Figure 4 : Relative change of mRNA presence coded by genes of PAM1, RZFP and MYB8144

Figure 5 : Relative change of mRNA presence coded by genes of SOS3, SOS1, cNHX1 and CCC12ac145

Figure 6 : Relative change of mRNA presence coded by genes of CMO, P5CS, cLEA5 and NCED146

Figure 7 : Relative change of mRNA presence coded by genes of CAT2 and GR147

ARTICLE 3

Figure 1: Growth rate, leaf stomatal conductance and relative leaf water loss of 2X and 4X Rangpur lime seedlings grown in control condition for 42 days.....	187
Figure 2: Light microscopy from leaf cross-section.....	188
Figure 3: Light microscopy from stem cross-section and root cross-section.....	189
Figure 4: Leaf gene expression ratio of 4X over 2X Rangpur lime through qRT-PCR.....	190

ARTICLE 4

Figure 1: Leaf stomatal conductance, quantum yield of PSII, weighing pots of C/2XRL or C/4XRL under water deficit during 24 days.....	213
Figure 2: Leaf stomatal conductance of C/2XRL or C/4XRL in control condition.....	214
Figure 3: Leaf ratio gene expression profile of Citron under water deficit over control condition for C/2XRL and C/4XRL trough real-time RT-PCR and root ratio gene expression profile of RL under water deficit over control condition for 2XRL and 4XRL trough real-time RT-PCR.....	215
Figure 4: Pictures and leaf water potential estimated for C/2XRL and C/4XRL in control condition and water deficit at the 24 th day of the experiment.....	216

ARTICLE 5

Figure 1: Leaf stomatal conductance, quantum yield of PSII and relative pots water loss of 2X RL/V and 4X RL/V grown in control condition and subjected to a water deficit for 31 days.....	245
Figure 2: Light microscopy from leaf cross-section (leaf central nerve: A and B, petiole: C and D and foliar limb: E and F). Left panels correspond to 2X, right panels correspond to 4X	246
Figure 3: Functional categories of induced genes between Valencia sweet orange grafted on RL4X and Valencia sweet orange grafted on RL2X.....	247
Figure 4: Gene expression in leaves from Valencia scion grafted on 2X and 4X Rangpur lime rootstocks, gene expression in roots of 2X and 4X Rangpur lime rootstocks grafted with Valencia scion, gene expression in roots of 2X RL/V and 4X RL/V genotypes grown in control condition and gene expression in roots of 2X RL/V and 4X RL/V genotypes after 31 days of stress.....	248
Supplemental Figure S1: Expression patterns of genes between Valencia sweet orange grafted on RL4X and Valencia sweet orange grafted on RL2X in response to water deficit	249

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Part de la production par catégorie dans les exportations agricoles de l'Espagne	24
Tableau 2 : Indices de la production agricole Espagnole de 1979 à 2004	24
Tableau 3 : Distribution par pays de la superficie affectée par la salinité : l'Afrique et l'Amérique	26
Tableau 4 : Distribution par pays de la superficie affectée par la salinité : l'Asie et l'Europe	27
Tableau 5 : Caractères physiques de différents types de sols.	33
Tableau 6 : Valeurs représentatives de l'humidité relative, du potentiel hydrique et de la concentration en vapeur d'eau absolue à 4 points du trajet de la dissipation de l'eau chez la feuille.....	35
Tableau 7 : Production mondiale d'agrumes par pays de 2001 à 2005	67
Tableau 8 : Modalités et conditions expérimentales de la 1 ^{ère} expérience de stress salin réalisée en Corse.....	86
Tableau 9 : Modalités et conditions expérimentales de la 2 ^e expérience de stress salin réalisée en Espagne.....	87
Tableau 10 : Modalités et conditions expérimentales de la 1 ^{ère} expérience de déficit hydrique réalisée en Espagne.	88
Tableau 11 : Modalités et conditions expérimentales de la 2 ^e expérience de déficit hydrique réalisée en Espagne.	89
Tableau 12 : Liste des amorces nucléaires utilisées dans l'étude du transcriptome entre la lime Rangpur diploïde et autotétraploïde par PCR en temps réel.	102
Tableau 13 : Liste des amorces nucléaires utilisées dans l'étude de l'expression génique par RT-PCR en temps réel chez le cédratier et l'oranger greffé sur la lime Rangpur diploïde et autotétraploïde	103

ARTICLE 1

Table 1: Percentage of tetraploid citrus plants in diploid seedlings	111
Table 2: Growth rate of diploid and tetraploid genotypes grown in control and salt stress conditions	113

ARTICLE 2

Table 1: Sequences of the primers used to monitor by realtime RT-PCR the expression of candidate genes136

Table 2: Leaf water content and leaf thickness of diploid and autotetraploid of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and their allotetraploid FLHORAG1 grown in control and after 49 days of salt stress137

Table 3: Sodium/chloride content ratio in leaf and root for diploid and autotetraploid of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and their allotetraploid FLHORAG1138

ARTICLE 3

Table 1: Thickness, surface area, stomatal size, stomatal density, greenness and Fm/Fv in leaves of 2X and 4X 6-months old-Rangpur lime.....182

Table 2: Anatomical characteristics of leaf, stem and root from 2X and 4X Rangpur lime seedlings.....183

Table 3: Relevant gene functional categories were identified as those having an Annotation Graph Score in the Blast2GO application (Goetz *et al.* 2008) equal or higher than 3 and an ontology hierarchical level greater than 4.....184

Table 4: Sequences of the primers used to confirm by real time RT-PCR the results of expression obtained with microarray.....185

ARTICLE 4

Table 1: Sequences of primers used by real time RT-PCR.....211

ARTICLE 5

Table 1: Gene accession number and function and primers used of the selected genes to confirm by RT-qPCR results of expression obtain through microarray.....241

Supplemental Table S3a: Significantly enriched functional categories in the group of genes induced by water deficit in 2XRL/V and 4XRL/V plants.....242

Supplemental Table S3b: Significantly enriched functional categories in the group of genes induced by water deficit in 2XRL/V and 4XRL/V plants.....243

LISTE DES ABREVIATIONS

AAO: Abscissique Aldéhyde Oxydase

ABA: Acide ABscissique

ABRE: ABA Element Response

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADNc: ADN complémentaire

AOX: Alternative OXidase

ARN: Acide RiboNucléique

ARNm: ARN mæssager

ATP: Adénosine TriPhosphate

BSA: Sérum Albumine Bovine

CA: Anhydrase Carbonique

CAO: Chlorophyllide A Oxygénase chloroplastique

CCR: Cinnamoyl CoA Réductase

Cdc2K: protéine Cdc2 Kinase

CTV: Citrus Tristeza Virus

DH: DéHydrine

DHAR: DéHydroAscorbate Réductase

dNTP: désoxyNucléotides TriphosPhate

DRE: Dehydration Response Element

DTT: DiThioThreitol

dUTP: désoxyUridine TriPhosphate

EDTA: EthyleneDinitro Tetraacetic Acid

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

ERD4: Early Response to Dehydration protein 4

EST: Expressed Sequence Tag

FAE: Fatty Acid Elongase

FAO: Food and Agriculture Organization

GO: Gene Ontology

GalS: Galactinol Synthétase

GST: Glutathione S-Transférase

H1F: Histone 1F

HKT: High-affinity K⁺ upTake

HSP: Heat Shock Proteins

HY-b: β-carotène HYdroxylase

HY-e: ε-carotène HYdroxylase

ICP-MS: Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer

IPP: diPhosphate d'IsoPentényl isomérase

LCY-b: Lycopène β-CYclase

LCY-e: Lycopène ε-CYclase

LEA: Late Embryogenesis Abundant

lhca2: Chlorophyll A-B binding protein

NADP: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NCED: 9-Cis-Epoxy hydroxy caroténoïde Dioxygénase

NSY: Néoxanthine SYnthétase

OEE: Chloroplast Oxygen-Evolving Enhancer protein

ONU: Organisation des Nations Unies

P5CS: Delta 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthétase

PC: Plastocyanin Chloroplast

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDS: Phytoène DéSaturase

PEPC: PhosphoEnolPyruvate Carboxylase

PS: Poids Sec

PSI: PhotoSystème I

PSII: PhotoSystème II

psaK: photosystem I subunit X

psbW: photosystem II reaction center W protein chloroplast

Px63: Peroxidase 63

ROS: Reactive Oxygen Species

RS: Raffinose Synthétase

RT-PCR: Reverse Transcription-PCR

RUBISCO: RibUlose-1,5-BIS-phosphate CarbOxylase

SDR: Short chain Dehydrogenase/Reductase

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate

SOD: SuperOxide Dismutase

SOS: Salt Overly Sensitive

SSC: Salt Sodium Citrate

SSR: Simple Sequence Repeats

TBS: Tris Buffered Saline

TPS: Trehalose-6-Phosphate Synthase

UNESCO: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization

UNU: United Nations University

VDE: Violaxanthine De-Epoxydase

WAX2: WAXe (protéine de la Cuticle)

ZDS: ζ-carotène DéSaturase

ZEP: Zéaxanthine Epoxydase

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1

1. INTRODUCTION

1.1. LA DESERTIFICATION : UNE MENACE CROISSANTE

La désertification est un phénomène naturel originellement indépendant des activités humaines : les grandes aires désertiques du monde se sont formées au cours du temps en suivant de lents processus naturels. Les paléodéserts, tel que le Sahara, sont de grandes étendues de sable stabilisées par la végétation à leur pourtour. Par datation à l'aide de pollen fossile, il est connu aujourd'hui que le désert du Sahara a été une savane fertile et que ses phases d'expansion, comme ses phases de retraits, correspondent aux grands bouleversements climatique qu'a connus la planète (Ritchie et Haynes, 1987 ; Schuster *et al.*, 2006). La désertification contemporaine est principalement due aux activités humaines qui accentuent le phénomène d'expansion de la désertification naturelle.

1.1.1. Le réchauffement climatique

Aujourd'hui, lorsque l'on parle de changement climatique, il s'agit plus principalement du réchauffement climatique, phénomène d'élévation durable des températures des océans et de l'atmosphère à l'échelle mondiale (*cf* Figure1). La communauté scientifique s'accorde pour attribuer ce changement aux activités humaines de ces 100 dernières années (Pachauri et Resinger, 2007).

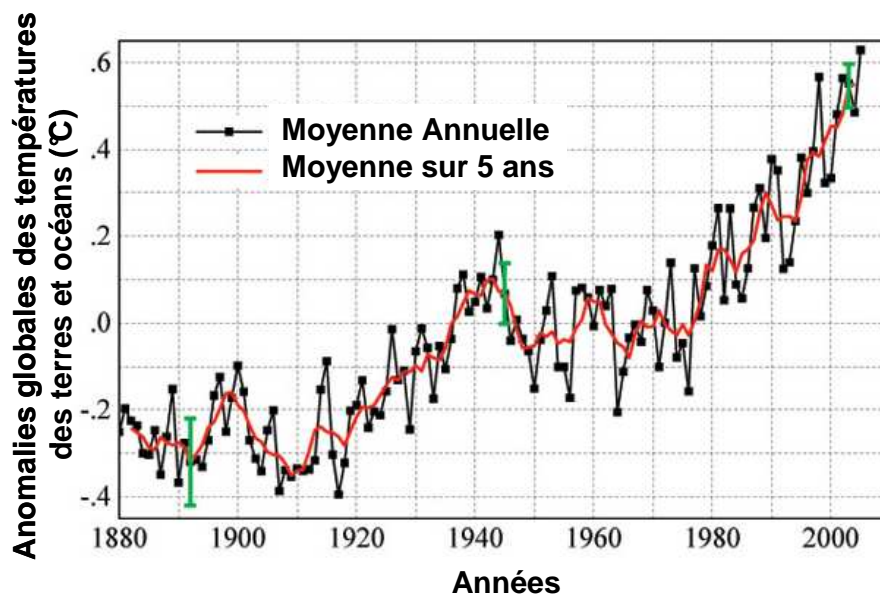


Figure 1 : Evolution des anomalies globales des températures des terres et océans relevées de 1880 à nos jours (source : NASA (2006)).

Le réchauffement climatique, conséquence d'un effet de serre additionnel dû aux rejets de gaz à effets de serre, est intimement lié aux émissions de CO₂ par combustion des matières carbonées fossiles. Phénomène naturel, l'effet de serre piège une partie du rayonnement infrarouge émis par la terre vers l'atmosphère terrestre et augmente ainsi la température de la troposphère (basse atmosphère). Cet effet maintient une température à la surface de la terre de 33°C supérieure à celle qu'elle ne serait sans son existence. La libération de CO₂ en quantité non négligeable dans l'atmosphère renforce ce phénomène, entraînant un accroissement des températures ainsi qu'un bouleversement des cycles climatiques et des écosystèmes (Alexiadis, 2007). La progression de la désertification des zones semi-arides fait partie des conséquences les plus connues du réchauffement climatique, au même titre que la fonte des glaciers et de la calotte glaciaire. L'expansion du désert de Gobi, ou encore du Sahel, durant les dernières décennies en est un bel exemple (Houero, 1993 ; Sheikh et Soomro, 2006 ; Gao et Giorgi, 2008). Ainsi, l'aire géographique d'expansion d'espèces cultivées, tel les agrumes, risque d'être repoussée dans les décennies à venir.

1.1.2. Une pression croissante sur les réserves d'eau

Les régions du monde sous climat désertique ou semi désertique, caractérisées par une évaporation supérieure aux précipitations, représentent environ 37% des terres émergées. Ces territoires s'accroissent d'année en année sous l'effet du réchauffement climatique, accentuant ainsi la pression sur les réserves d'eau douce. Cependant, deux autres facteurs aggravent cette pression. En premier lieu, la pollution des cours d'eau et nappes phréatiques. Cette pollution est principalement due aux activités humaines issues de l'industrie, de l'agriculture et des usages domestiques. En second lieu, la surpopulation humaine (*cf* Figure 2). En 2008, la population mondiale était estimée à 6,705 milliards d'individus, alors qu'elle n'était que de 6,1 milliards en 2000, 1,55 milliards en 1900 et seulement d'environ 600 millions d'individus en 1700 (Kremer, 1993 ; Alvarez-Perello, 2001). Bien que 72% de la surface terrestre soit recouverte d'eau, 97% de celle-ci est présente sous forme salée. Des 3% d'eau douce restant, 2% sont mobilisés sous forme de glace et seulement 1% est disponible sous forme libre (de Marsily, 1995). De ces 1% dépend l'ensemble des besoins mondiaux, qu'il s'agisse de l'irrigation des cultures ou de la consommation humaine. Or, l'accroissement de la population mondiale augmente la demande en produits agricoles (Dyson et Ograda, 2002). Pour répondre à cette demande croissante, la superficie des terres agricoles a été étendue à des zones plus arides. Ceci a été rendu possible grâce à une irrigation intensive puisant directement dans les

réserves naturelles. L'association de l'ensemble de ces phénomènes a accentué la dégradation des sols (érosion hydrique, salinisation des sols, etc.).

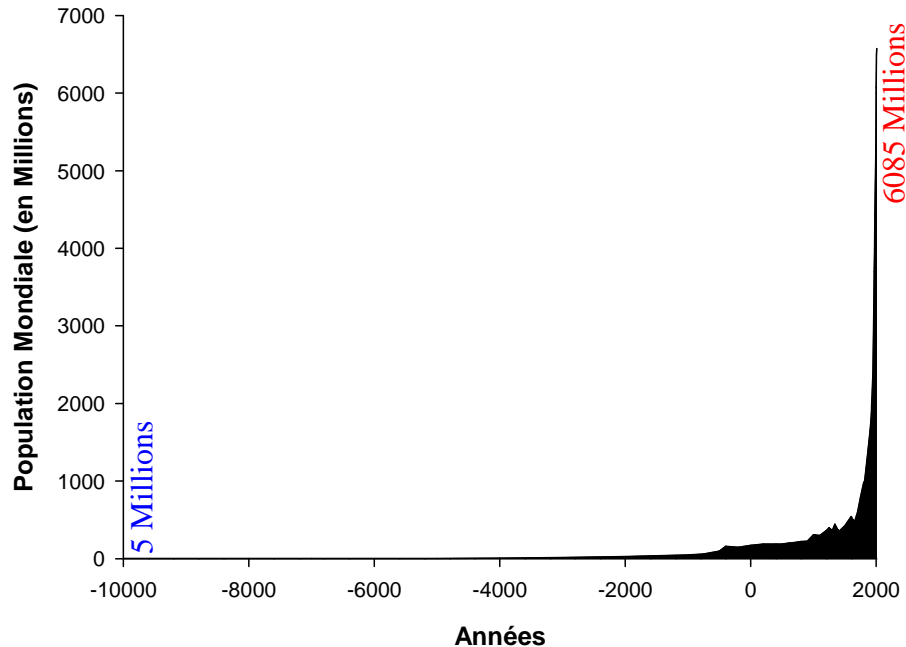


Figure 2 : Evolution démographique de la population mondiale de -10000 ans à l'an 2000 (sources : US Census Bureau ; ONU (2008)).

1.1.3. La dégradation des sols

L'aridification, principalement due au changement climatique et aux activités humaines locales, conduit à une dégradation des terres et à un appauvrissement biotique. Les activités humaines impliquées dans le processus de désertification par dégradation des sols sont l'industrialisation, le tourisme, le surpâturage et l'irrigation. D'après une étude publiée par l'ONU (Organisation des Nations Unies) en 2000, les déserts, qu'ils soient chauds ou froids, représentaient près de 44% de la surface terrestre en 1977 contre 63% en 2000. L'UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization) a estimé qu'un tiers de la part des terres émergées étaient menacées de désertification en 2006. Pour illustration, la désertification que connaît le Sahel est le fait d'une poussée démographique (à raison de 3% par an au début du siècle) et de l'érosion accélérée des sols. L'accroissement de la population augmente les besoins entraînant une surexploitation des terres arables. Ainsi, pour accroître les rendements annuels, la jachère fut abandonnée dans les années 1960 et l'extension du surpâturage, combinée à la surexploitation du bois, a épuisé les capacités de

renouvellement de la flore. La disparition du couvert végétal et le renforcement des phénomènes naturels sous l'effet du réchauffement climatique, comme le vent et la pluie, ont accentué l'érosion des sols. Il en résulte un affaiblissement de la biodiversité et une baisse de la capacité de production (Sheikh et Soomro, 2006 ; Rey-Benayas *et al.*, 2007). Selon une communication datée du 14 décembre 2006 de l'ONU (United Nations University), si la dégradation des sols poursuit son rythme actuel, l'Afrique sera tout juste capable de nourrir 25% de sa population en 2025. De nos jours, la désertification est principalement induite par les activités humaines, mais ses origines sont multiples et variées : le surpâturage, la surexploitation agricole, l'augmentation de la fréquence des feux, les retenues d'eau, la déforestation, le tarissement des eaux souterraines, l'accroissement de la salinité des sols et le changement climatique (Rozanov, 1977 ; Sivakumar, 2007).

Les abords des déserts, lorsqu'ils ne sont pas bordés de montagnes, présentent une transition graduelle d'un environnement sec à un environnement plus humide. Cette zone de transition, la plus exposée, est aussi la plus vulnérable. Elle abrite généralement des écosystèmes fragiles dépendants d'une multitude de microclimats. Des îlots de végétations permettent de faire front aux vents chauds provenant du désert et de protéger ainsi les terres de l'érosion (Dregne, 1986). La végétation permet aussi de garder ces zones plus fraîches après les pluies. Sur ces territoires, les activités humaines mettent en péril les écosystèmes en place, ce qui se traduit par une dégradation des terres (Sivakumar, 2007). En martelant le sol de leurs sabots, le bétail tasse le substrat, ce qui a pour effet d'augmenter la proportion de matières fines tout en réduisant le taux de percolation du sol. De fait, l'érosion du sol par les vents et l'eau de pluie en est facilitée (Ibanez *et al.*, 2007). La collecte du bois de chauffe et les pâturages réduisent le couvert végétal. Or, ce sont les végétaux qui, en maintenant le substrat, préviennent toute érosion des sols. La sédentarisation des exploitations aux dépens des pratiques culturelles nomades de jadis en est la cause (Dregne, 2002 ; Fullen et Catt, 2004 ; Sheikh et Soomro, 2006). La plupart des zones arides et semi-arides peuvent soutenir une agriculture locale, mais l'augmentation de la population ou une réduction des précipitations peut conduire à la disparition de certaines espèces végétales. Le sol est exposé aux vents et les couches supérieures s'érodent. Les zones d'ombre disparaissent avec la réduction du couvert végétal, augmentant le taux d'évaporation qui entraîne des remontées de sels à la surface. Le substrat devient salin et empêche le développement d'un nouveau couvert végétal. Une réduction des zones arborées est synonyme d'une réduction de la capacité de rétention de l'humidité, ce qui conduit à une baisse des précipitations et à un assèchement du climat. L'effet d'un processus de désertification peut s'inscrire dans un phénomène d'aridification

générale comme il peut initier un changement de climat localement. Les déserts avancent de manière erratique, des poches arides peuvent se former rapidement loin du désert naturel (Sivakumar, 2007).

1.1.4. La lutte contre la désertification

Si de nombreuses mesures ont été prises afin de freiner l'avancée de la désertification et de regagner les terres perdues, celles-ci ne traitent que les effets de la désertification sans tenir compte des véritables causes que sont le surpâturage, la surexploitation agricole et la déforestation. Ces mesures se concentrent principalement sur le ravitaillement en eau, la fixation et l'enrichissement des sols affectés. Le forage de nouveaux puits ou la construction de pipeline permet l'approvisionnement en eau dans les contrées menacées de désertifications. La fixation des sols est réalisée grâce au reboisement et à l'implantation de coupe-vents. Ces coupe-vents sont essentiellement constitués d'arbres et de buissons qui participent à réduire l'érosion des sols (Bofah et Owusu, 1986 ; Sheikh et Soomro, 2006). Afin de freiner l'avancée du Sahara, leurs implantations au Sahel ont été fortement encouragées par les organismes de développement dans les années 1980. La fertilité des sols peut être restaurée par l'implantation d'espèces légumineuses, de cultures vivrières ou de vergers comme, parmi les plus communes, le sorgho, le haricot, le dattier ou les agrumes. En effet, ces plantes absorbent une grande quantité d'azote de l'atmosphère pour la fixer, par la suite, dans le sol. Dans les vergers, des pierres sont empilées à la base des arbres. Elles permettent de récupérer l'eau de rosée par condensation et de maintenir l'humidité du sol. Enfin, des sillons sont artificiellement creusés dans le sol afin de retenir les eaux de pluies et de faciliter la capture des graines emportées par les vents.

Une autre méthode consiste en la mise en place de grilles à l'orée des zones désertiques. Utilisées au Moyen-Orient et littéralement appelées « barrières de sable », ces grilles, qui comportent de la paille, délimitent des zones d'1 m² dans lesquelles sont plantés arbres et arbustes. Grâce à la protection offerte par la paille, les arbres peuvent développer leurs racines et faire front aux vents du désert. Cependant, ce système est critiqué, car les arbres consomment et épuisent les ressources en eau de leur zone d'implantation (Moomen et Barney, 1981). Un projet similaire est en voie de réalisation en Chine pour faire barrage à la progression des déserts issus des activités humaines. La muraille verte de Chine, dont le nom fait référence à la grande muraille de Chine, est en cours de plantation sur près de 5700 Km au nord est du pays (Zhao *et al.*, 2008).

1.2. LA SALINITE DES SOLS : ORIGINES ET CONSEQUENCES

1.2.1. Les sols salins

Dans les régions arides, l'irrigation à partir des eaux de surface est restreinte naturellement par une évaporation supérieure aux précipitations. De fait, l'eau utilisée en irrigation est surtout puisée dans les réserves souterraines. La qualité de cette eau est donc étroitement liée à celle du sol. Tout apport d'eau effectué lors de l'irrigation est associé à un apport de sels. En effet, même l'eau de la meilleure qualité présente une quantité de sels dissous, même si celle-ci est supposée négligeable. Avec le temps et les apports successifs par irrigation, les sels se concentrent dans le sol car l'eau y dépose continuellement les sels en s'évaporant. Ce phénomène est accru dans les régions arides. Les eaux souterraines et de surfaces y sont relativement riches en sels car la nature des sols par lesquels s'infiltré l'eau est généralement composée de minéraux facilement altérables. De plus, le climat sec génère une forte composante évaporative du sol et de la végétation qui oblige à augmenter la quantité d'eau utilisée lors de l'irrigation. Les eaux d'irrigations contiennent de nombreux ions tels que les ions magnésium (Mg^{2+}), les ions calcium (Ca^{2+}), les ions bicarbonate (HCO_3^-), les ions carbonate (CO_3^{2-}), et les ions sulfate (SO_4^{2-}) (Yu *et al.*, 2007). Cependant, ce sont les ions sodium (Na^+) et chlorure (Cl^-) qui sont les plus à même de se retrouver en fortes concentrations dans les eaux d'irrigation, et donc, qui auront les effets les plus nocifs sur les cultures. En forte concentration dans le sol, le sodium peut alors saturer la majeure partie des sites d'échanges colloïdaux. Ces sols appelés « sodiques » sont extrêmement peu fertiles (Marlet *et al.*, 1997).

Pour répondre à la demande alimentaire croissante, l'exploitation intensive des terres arables a été développée (*cf* Figures 3 et 4). Il en résulte aujourd'hui une salinisation des sols qui est devenue la première cause de dégradation des terres. Les principales conséquences de ce phénomène sont la salinisation, l'engorgement et la sodication des sols. La surface affectée par la salinisation est estimée à près de 400 Mha (Bot *et al.*, 2000).

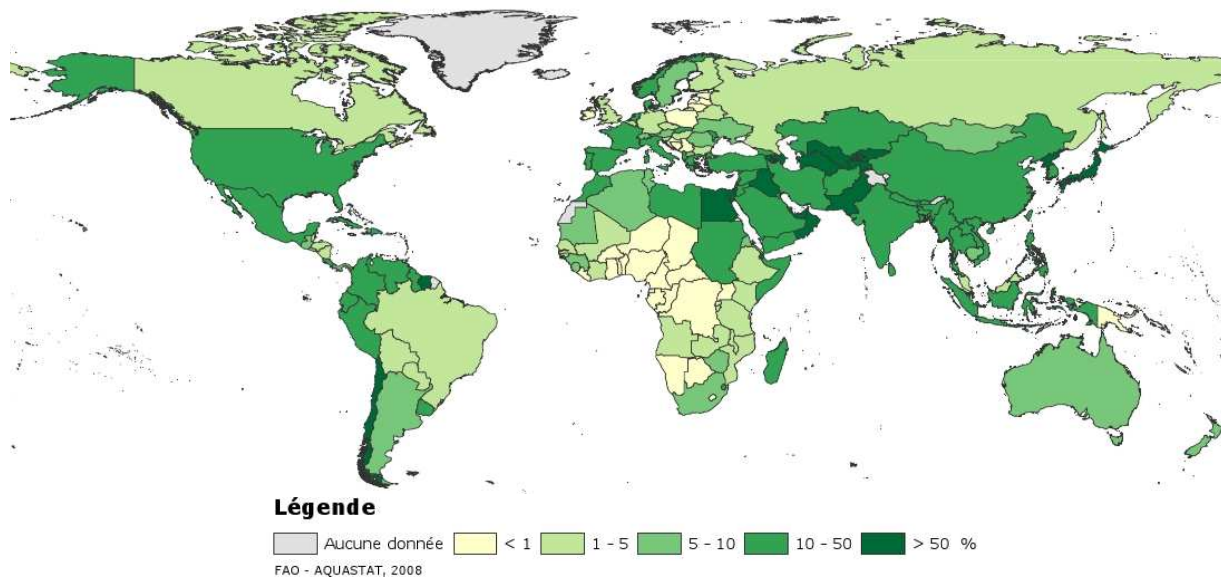


Figure 3 : Part de la superficie cultivée irriguée : superficie équipée pour l'irrigation en pourcentage de la superficie cultivée en 2003 (source : FAO-AQUASAT (2008)).

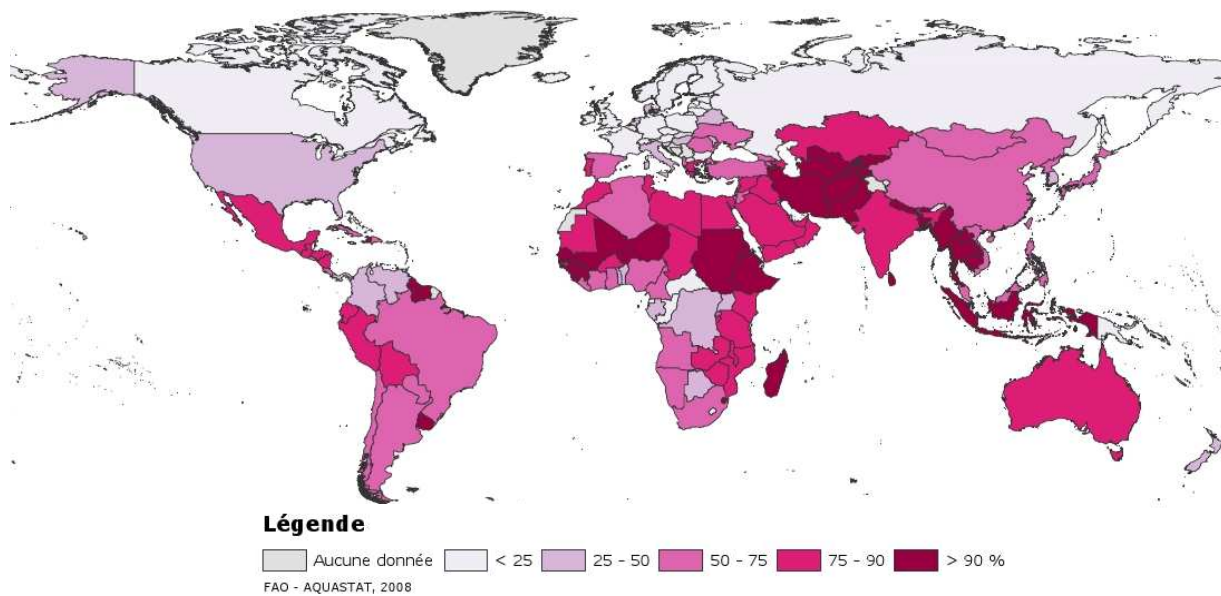


Figure 4 : Part d'eau prélevée par l'agriculture : prélèvement de l'eau par l'agriculture en pourcentage du prélèvement total d'eau pour les usages agricoles, domestiques et industriels en 2001 (source : FAO-AQUASAT (2008)).

1.2.2. Origines de la contamination des sols par les sels

La salinisation des sols est dite primaire ou secondaire selon son origine naturelle ou humaine. La salinisation primaire se produit lorsque la roche mère du sol recèle une grande quantité en sels solubles ou lorsqu'une nappe phréatique se trouve proche de la surface. Les faibles précipitations et un drainage restreint aux régions arides et semi-arides ne permettent pas d'assurer l'élimination des excès de sels. Les sels s'accumulent alors dans le sol jusqu'à atteindre des concentrations importantes. La salinisation primaire représente 80% des terres salinisées. La salinisation secondaire, soit 20% des terres salinisées, est due à un apport en sels via l'irrigation (source FAO. Disponible sur : http://www.agrireseau.qc.ca/agroenvironnement/documents/Salinisation_irrigation.pdf). En effet, la rareté de l'eau dans les pays désertiques incite à des pratiques d'irrigation non conventionnelles. Par exemple, une eau à forte teneur en sels, telles que des eaux usées ou de l'eau de mer désalinisée, est souvent utilisée en irrigation au pourtour des régions désertiques. Ces pratiques d'irrigation modifient peu à peu la structure et la perméabilité des sols (Orzepowski et Pulikowski, 2008).

De nombreux problèmes de salinité des sols en agriculture sont associés à la présence d'une nappe phréatique proche de la surface du sol (inférieure à 2 mètres de profondeur). L'irrigation en surface entraîne une accumulation des sels dans le sol, qui se retrouvent rapidement concentrés dans la nappe phréatique. Selon les conditions climatiques, l'eau saline de ces nappes peut remonter facilement par capillarité jusqu'à la zone racinaire des plantes.

Souvent, lorsque l'eau douce souterraine se situe à proximité d'une source d'eau salée, il arrive que la première soit contaminée par la seconde. Par exemple, le prélèvement d'eau d'un aquifère en connexion avec l'eau de mer peut modifier l'équilibre de gradients existant et générer un flux d'eau saline vers l'aquifère. On parle alors d'intrusion d'eau de mer.

De nombreuses études montrent que l'eau emprisonnée dans des strates sédimentaires peut devenir extrêmement saline en fonction de la profondeur (Craig, 1980). L'eau peut ainsi devenir naturellement riche en sulfate lorsqu'elle est proche de la surface, riche en bicarbonate pour une profondeur intermédiaire et plus concentrée en chlorure à de grandes profondeurs. La salinisation de l'eau séquestrée dans ces roches peut être expliquée par l'érosion et la solubilisation des roches et sédiments à son contact (Tang *et al.*, 1978 ; Szabolcs et Molnar, 1980).

Les sources d'eau douce des régions côtières peuvent devenir salines sous l'influence des marées. A marée haute, l'eau de mer remonte le courant des cours d'eau et gagne l'intérieur des terres par les canaux de drainage. Ce phénomène peut altérer significativement

la qualité des eaux des cours d'eau et canaux de drainage, en particulier en période de sécheresse où les courants sont faibles. Les cultures en zone côtière sont aussi soumises au sel des embruns : les vents et la pluie disséminent le sel des embruns à l'intérieur des terres et contaminent les terres arables des abords des côtes (Subramanyam et Sinha, 1985).

La réutilisation des eaux de drainage est une autre source de salinisation des sols. Pour de nombreux pays confrontés à de graves problèmes de sécheresse, il n'est pas rare que l'eau de drainage récupérée après une première irrigation soit réutilisée une seconde fois. Même si les concentrations en sel de l'eau drainée peuvent être variables, cette eau est toujours plus concentrée en sel que ne l'est celle qui est utilisée de manière conventionnelle (Rhoades *et al.*, 1992).

1.2.3. Contamination des eaux d'irrigation : l'exemple de la communauté Valencienne (Espagne)

La salinisation des sols affecte la plupart des zones arides et semi-arides, au premier rang desquels se trouvent les pays du pourtour méditerranéen, dont l'Espagne. La communauté Valencienne longe la côte Est de l'Espagne face aux îles Baléares. Cette région bénéficie d'un climat doux propice au développement de l'agrumiculture. Elle est d'ailleurs la première zone de production d'agrumes en Méditerranée, en particulier en ce qui concerne les oranges et les mandarines (sources FAO. Disponible sur : <http://www.unctad.org/infocomm/anglais/orange/market.htm>). Cependant, cette performance a été rendue possible grâce à une irrigation intensive permettant l'extension des cultures. Il en a résulté un épuisement des ressources naturelles en eau qui, peu à peu, ont perdu leurs capacités de renouvellement. Aujourd'hui, de nombreux cours d'eau asséchés témoignent de cette mauvaise gestion des ressources. L'accroissement de la désertification dans cette région s'est accompagné de problèmes liés à une augmentation de la teneur en sel des sols. Le développement des cultures irriguées de ces deux dernières décennies en Espagne (*cf* Tableaux 1 et 2) n'a fait qu'amplifier ce phénomène. Actuellement, en Espagne, la surface affectée par une salinisation du sol est estimée à 2,4 millions d'hectares. Ces sols peuvent présenter une salinité primaire, mais la majorité de cette contamination est d'origine secondaire (sources FAO. Disponible sur : <http://www.fao.org/ag/aGL/agll/spush/topic2.htm#spain> ; Mendez-Romero *et al.*, 2005).

Tableau 1 : Part de la production par catégorie dans les exportations agricoles de l'Espagne (source : FAOSTAT (2006)).

	En millier de tonnes			En millions de dollars US		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
Total des Exportations				125 740.4	156 146.6	178 520.7
Total des Exportations Agricoles				16 452.2	21 441.6	24 293.6
Huile d'Olive	567.5	513.8	648.7	1 140.9	1 355.6	2 033.6
Vin	901.6	1 175.8	1 352.2	1 215.2	1 598.5	1 835.6
Pomelos, Mandarines et Clémentines	1 268.3	1 437.6	1 420.5	956.3	1 285.2	1 321.3
Oranges	1 476.8	1 442.8	1 504.1	818.8	968.8	1 183.3
Tomates	910.5	946.5	1 023.0	728.0	875.2	971.9
Piments et Poivrons verts	432.5	429.4	395.4	405.6	563.7	675.0
Porc	187.7	224.4	264.1	338.9	467.8	631.4
Laitue	478.1	462.1	574.1	359.6	511.5	556.8
Olives	297.7	325.2	305.7	387.1	499.0	552.7

Tableau 2 : Indices de la production agricole Espagnole de 1979 à 2004 (source : FAOSTAT (2006)).

Indicateurs		Unité	1979-1981	1989-1991	1999-2001	2002	2003	2004
Population et travailleurs agricoles	Population	1000 habitants	37 520	39 297	40 745	40 977	41 060	41 128
	Population rurale/Population totale	%	27	25	24	24	23	23
	Densité	Population/Km ²	75	79	82	82	82	...
	Travailleurs agricoles	1000 habitants	2 609	1 897	1 330	1 220	1 165	1 113
	Travailleurs agricoles/Population active totale	%	19	12	7	7	6	6
Utilisation des terres	Total des terres disponibles	1000 Ha	49 949	49 944	49 899	49 904	49 921	...
	Terres arables	1000 Ha	15 568	15 368	13 421	13 738	13 738	...
	Terres irriguées	1000 Ha	3 028	3 387	3 719	3 780	3 780	...
Production agricole	Production agricole par habitant	1999/2001=100	78	89	100	102	112	105
Commerce	Export - Import	Millions US \$	- 606.1	- 252.1	2 970.4	3 498.8	5 122.4	4 495.2
Pratiques agricoles	Population totale/Terres arables	Population/Ha	2	3	3	3	3	...
	Utilisation des fertilisants/Terres arables	Kg/Ha	101	128	166	157
	Tracteurs/Terres arables	Nbr/1000Ha	33.5	48.1	67.2	68.9	68.7	...

Les eaux souterraines de la communauté Valencienne sont alimentées par des aquifères côtiers qui, du fait de leur proximité, sont en étroit contact avec les eaux marines. La surexploitation des réserves souterraines a perturbé l'équilibre existant entre eau douce et eau salée, conduisant à une intrusion de l'eau de mer dans les aquifères côtiers. Cette intrusion a considérablement dégradé la qualité des eaux souterraines et augmenté leur teneur en sel. Aujourd'hui, plusieurs types de sols salins ont été détectés dans la région Valencienne. A l'intérieur des terres, la salinisation des sols est d'ordre primaire. Elle est principalement due à la présence de grandes quantités de sulfate de calcium provenant des strates du triasique. Le long de la côte, elle est à la fois d'ordre primaire et secondaire. D'ordre primaire de part les acides sulfates contenus dans la tourbe des zones lagunaire et d'ordre secondaire de part l'utilisation d'eau saumâtre en irrigation (Mendez-Romero *et al.*, 2005), cette eau, dont la salinité est due aux intrusions d'eau de mer dans des aquifères surexploitées, a généré des sols sodiques au fur et à mesure des irrigations successives. Ces sols ont une forte teneur en sels solubles, principalement des chlorures, des sulfates de sodium et magnésium. En conséquence, aujourd'hui, les rendements des vergers d'agrumes sont fortement affectés par l'accroissement de la teneur en sel des sols (sources FAO. Disponible sur : <http://www.fao.org/ag/aGL/agll/spush/topic2.htm#spain>). Ceci s'ajoute à la crise que connaît le secteur agrumicole espagnol en proie à une forte concurrence de ses voisins du sud. De nos jours, de nombreux professionnels préfèrent se reconverter et délaisser leurs exploitations, mettant en jeu la pérennité du secteur agrumicole en Espagne, et plus particulièrement à Valence (Pascual *et al.*, 2005).

Au-delà de l'Espagne et de la communauté Valencienne, de nombreuses nations en danger de désertification encourent un risque aggravé de dégradation des sols par salinisation des eaux d'irrigation (*cf* Tableaux 3 et 4).

Tableau 3 : Distribution par pays de la superficie affectée par la salinité : l'Afrique et l'Amérique (Abrol *et al.*, 1988).

Continent	Pays	Surface (en millier d'Ha)		Total
		Sols Salins	Sols Sodiques	
Amérique du nord	Canada	264	6 974	7 238
	USA	5 927	2 590	8 517
Amérique centrale	Cuba	316	-	316
	Mexique	1 649	-	1 649
Amérique du sud	Argentine	32 473	53 139	85 612
	Bolivie	5 233	716	5 949
	Brésil	4 141	362	4 503
	Chili	5 000	3 642	8 642
	Colombie	907	-	907
	Equateur	387	-	387
	Paraguay	20 008	1 894	21 902
	Pérou	21	-	21
	Venezuela	1 240	-	1 240
Afrique	Algérie	3 021	129	3 150
	Angola	440	86	526
	Botswana	5 009	670	5 679
	Tchad	2 417	5 850	8 267
	Egypte	7 360	-	7 360
	Ethiopie	10 608	425	11 033
	Gambie	150	-	150
	Ghana	200	118	318
	Guinée	525	-	525
	Guinée-Bissau	194	-	194
	Kenya	4 410	448	4 858
	Libéria	362	44	406
	Libye	2 457	-	2 457
	Madagascar	37	1 287	1 324
	Mali	2 770	-	2 770
	Mauritanie	640	-	640
	Maroc	1 148	-	1 148
	Namibie	562	1 751	2 313
	Niger	-	1 389	1 389
	Nigeria	665	5 837	6 502
	Rhodésie	-	26	26
	Sénégal	765	-	765
	Sierra Leone	307	-	307
	Somalie	1 569	4 033	5 602
	Soudan	2 138	2 736	4 874
	Tunisie	990	-	990
	Cameroun	-	671	671
	Tanzanie	2 954	583	3 537
	Zaire	53	-	53
	Zambie	-	863	863

Tableau 4 : Distribution par pays de la superficie affectée par la salinité : l'Asie et l'Europe (Abrol *et al.*, 1988).

Continent	Pays	Surface (en millier d'Ha)		Total
		Sols Salins	Sols Sodiques	
Asie du sud	Afghanistan	3 103	-	3 101
	Bangladesh	2 479	538	3 017
	Inde	23 222	574	23 796
	Iran	26 399	686	27 085
	Iraq	6 726	-	6 726
	Israël	28	-	28
	Jordan	180	-	180
	Kuwait	209	-	209
	Oman	290	-	290
	Pakistan	10 456	-	10 456
	Qatar	225	-	225
	Sarawak	1 538	-	1 538
	Arabie Saoudite	6 002	-	6 002
	Sri Lanka	200	-	200
	Syrie	532	-	532
	Emirats Arabes Unis	1 089	-	1 089
Asie Centrale et du nord	Chine	36 221	437	36 658
	Mongolie	4 070	-	4 070
	Ex-USSR	51 092	119 628	170 720
Asie du Sud-est	Kampuchéa	1 291	-	1 291
	Indonésie	13 213	-	13 213
	Malaysia	3 040	-	3 040
	Vietnam	983	-	983
	Thaïlande	1 456	-	1 456
Asie australe	Australie	17 269	339 971	357 240
	Fiji	90	-	90
	Iles Salomon	238	-	238
Europe	Tchécoslovaquie	6.2	14.5	105.7
	France	175.0	75.0	250.0
	Hongrie	1.6	384.5	1 271.6
	Italie	50.0	-	450.0
	Roumanie	40.0	210.0	250.0
	Espagne	/	/	840.0
	Ex-USSR	7 546.0	21 998.0	47 325.0
	Yugoslavie	20.0	235.0	255.0

1.2.4. Impact de la contrainte saline sur les cultures

La salinisation des sols irrigués affecte les cultures à trois niveaux distincts. Premièrement, elle accroît la pression osmotique du sol : le pouvoir d'absorption de l'eau de la racine en est réduit et il est nécessaire d'accroître les fréquences d'arrosage afin de répondre aux besoins des plantes (Urayama *et al.*, 2008 ; Ben-Gal *et al.*, 2009). Deuxièmement, la toxicité des ions : les ions sont absorbés par les plantes avec l'eau et

peuvent altérer ainsi le rendement des cultures selon leur degré de sensibilité (Urayama *et al.*, 2008). Troisièmement, la dégradation du sol par modification de ses propriétés : par exemple, une augmentation de la concentration en sels du sol abaisse sa conductivité hydraulique et entraîne un changement de son état structural (Chang *et al.*, 1997 ; Urayama *et al.*, 2008).

Sous l'effet de l'évapotranspiration, les sels se concentrent préférentiellement au niveau de la zone racinaire. Cette concentration aux abords des racines rend plus difficile l'absorption de l'eau par la plante. Il en résulte un déficit hydrique qui réduit le taux de croissance des plantes et leur rendement. Les symptômes apparents peuvent être similaires à ceux d'un déficit hydrique comme, par exemple, une fanaison ou un accroissement de la cire foliaire (Latif et Ilyas, 1990 ; Urayama *et al.*, 2008). Si les apports d'eau sont supérieurs aux besoins des plantes, les sels solubles peuvent être entraînés plus profondément dans le sol, en dessous de la zone racinaire, par lessivage (ou lixiviation). Dans ce cas, la concentration en sel augmente avec la profondeur. En effet, les plantes absorbent préférentiellement l'eau pure qui est plus facile d'accès, et délaissent les sels qui sont entraînés en profondeur avec la lixiviation. Une faible profondeur d'enracinement est observée lors d'un stress salin et celle-ci varie en fonction de l'importance de la lixiviation. Cela s'explique par le fait que l'absorption de l'eau est plus aisée au niveau de la partie supérieure de la zone racinaire, où la concentration en sels est plus faible. Les racines s'y développent donc préférentiellement. Ce phénotype est différent de celui observé lors d'un déficit hydrique où les racines se développent en profondeur vers les parties plus humides du sol (Schleif, 1982 ; Latif et Ilyas, 1990 ; Sanjay Singh Singh, 1999).

Des baisses de rendements peuvent survenir en raison de l'assimilation des ions à des niveaux toxiques par la plante. En effet, la plante, en absorbant l'eau dont elle a besoin, prélève également les ions nocifs contenus dans le sol salin. Les dommages induits par la toxicité des ions dépendent de l'absorption et de la sensibilité des espèces cultivées (Lima-Costa, 2002). L'arboriculture, et plus spécialement l'agrumiculture, est généralement considérée comme l'une des cultures les plus sensibles à la toxicité ionique (Ayers et Westcot, 1989). Les symptômes caractéristiques sont généralement des brûlures et des chloroses foliaires (Ayers et Westcot, 1989 ; Vollenweider et Gunthardt-Goerg, 2006). Les ions toxiques, essentiellement les ions sodiums et chlorures, sont nocifs à de faibles concentrations (Ayers et Westcot, 1989 ; Boman *et al.*, 2005). Ces ions sont absorbés par la racine avec l'eau, puis ils sont transportés via le flux transpiratoire jusqu'aux feuilles. Les ions s'accumulent alors dans les feuilles, préférentiellement aux parties de la feuille où les pertes d'eau sont les plus grandes, *i.e.* à l'extrémité (chlorures) et aux bordures (sodiums) de

celles-ci. Les feuilles les plus vieilles sont affectées en premier. Cette accumulation est lente, de ce fait, l'apparition des symptômes est souvent tardive. La formation de nécroses précède souvent une chute précoce des feuilles, voire, une défoliation. Les dommages engendrés dépendent beaucoup du temps d'exposition, de la concentration en ions toxiques, de la sensibilité des cultures et du volume d'eau consommé par les plantes. Par exemple, l'accumulation est très rapide durant la période printemps/été alors qu'elle est pratiquement inexistante en automne/hiver (Ayers et Westcot, 1989 ; Boman *et al.*, 2005). Le seuil de tolérance généralement estimé en arboriculture est de 0,25 à 0,50 % du poids sec pour les sodiums et de 0,3 à 1 % du poids sec pour les chlorures (Ayers et Westcot, 1989). L'absorption des ions toxiques peut se faire directement au niveau des feuilles. Une irrigation par aspersion dépose l'eau saline directement sur les feuilles. Les ions sodiums et chlorures seront alors plus rapidement absorbés par les feuilles. Ceci peut être très dommageable pour des cultures sensibles comme les agrumes, car la toxicité et la vitesse de propagation en sont décuplées (Grieve *et al.*, 2003).

Une modification de la perméabilité du sol peut être liée à l'utilisation d'une eau de médiocre qualité lors de l'irrigation. Le taux d'infiltration de l'eau est alors réduit. L'eau reste à la surface plus longtemps et s'infiltre plus lentement dans le sol, retardant d'autant sa progression vers la racine. De fait, l'approvisionnement en eau devient insuffisant pour maintenir un rendement acceptable. Deux facteurs liés à la qualité des eaux d'irrigation influencent particulièrement la pénétration de l'eau dans le sol. Il s'agit de la salinité de l'eau, soit la quantité totale des sels, et sa concentration relative en sodium par rapport aux ions calcium et magnésium (Darab *et al.*, 1980 ; Ayers et Westcot, 1989 ; Shein *et al.*, 1996). En effet, une forte salinité de l'eau augmentera l'infiltration, mais une eau avec une forte concentration de sodium par rapport au calcium la réduira. Ces deux facteurs peuvent agir en même temps. Si les périodes d'irrigation sont prolongées avec une baisse du taux d'infiltration, des problèmes secondaires peuvent survenir, comme un engorgement des terres et la génération d'une croûte de sel, le pourrissement des graines et des racines, des désordres nutritionnels, la multiplication des mauvaises herbes et l'apparition de maladies favorisée par la prolifération des vecteurs de transmission (moustiques) (Ayers et Westcot, 1989).

1.3. L'EAU ET LES PLANTES

1.3.1. Les mouvements d'eau entre l'intérieur et l'extérieur des cellules

• *Diffusion de l'eau, flux de masse et osmose*

Les molécules d'eau en solution sont en mouvement perpétuel, glissant les unes sur les autres. Ce phénomène, appelé la diffusion, est à l'origine du mouvement net des molécules des parties les plus concentrées aux parties les moins concentrées. Le second processus connu par lequel est induit des mouvements d'eau est le flux de masse. Il s'agit de mouvements combinés de groupes de molécules en masse, souvent engendrés par des gradients de pression. L'écoulement de l'eau de pluie ou d'une rivière est un exemple appliqué de ce phénomène. Le flux de masse est le phénomène qui autorise le transport longue distance des flux d'eau à travers le xylème. Il est aussi à l'origine des mouvements d'eau dans le sol comme à travers les barrières cellulaires des tissus végétaux. A contrario du phénomène de diffusion, le flux de masse, qui est conduit par la pression, est indépendant des gradients de concentration de solutés.

La perméabilité sélective, caractéristique des membranes cellulaires, facilite le passage de l'eau et des petites substances non chargées par rapport aux macromolécules chargées (Stein, 1986). Cette propriété est à l'origine du phénomène d'osmose, soit un mouvement d'eau s'instituant entre 2 milieux de potentiel hydrique différent séparés par une membrane perméable aux molécules d'eau. L'osmose est donc régie à la fois par le phénomène de diffusion et par le phénomène de flux de masse. La somme des forces engendrées par les gradients de solutés et les masses d'eau en mouvement commandent donc la direction et l'importance des flux d'eau à travers la membrane (Finkelstein, 1987).

• *Le potentiel hydrique*

En solution aqueuse, toute substance, que ce soit des ions ou des molécules, exerce une force d'attraction sur les molécules d'eau. De fait, plus une solution est concentrée, plus la force d'attraction est forte et moins les molécules d'eau sont libre de la quitter. Les mouvements d'eau s'instaurant entre des solutions de concentrations différentes s'effectuent toujours vers la solution où l'eau subit le moins les forces d'attraction, autrement dit, la solution la moins concentrée. Le potentiel hydrique est une appréciation de l'énergie nécessaire à ces mouvements d'eau entre deux milieux. Le potentiel hydrique d'une plante est sous l'influence de trois facteurs : la concentration, la pression et la gravité. La concentration

en solutés, ou potentiel osmotique, détermine le degré de liberté de l'eau dans la solution. La pression, ou plus précisément la pression hydrostatique, correspond à la pression exercée aux membranes, à la barrière cellulaire et aux vaisseaux conducteurs comme le xylème. Elle est appelée pression de turgescence lorsqu'elle est positive, ou tension lorsqu'elle est négative. Enfin, la gravité qui contraint l'écoulement de l'eau vers le bas.

Le potentiel hydrique gouverne le transport à travers la membrane cellulaire, mais il est aussi un bon indicateur du statut hydrique de la plante. En raison de la perte d'eau issue de la transpiration, la plante n'est que très rarement complètement hydratée. Lorsque une période de sécheresse survient, le déficit hydrique conduit à de nombreux changements physiologiques chez la plante, parmi lesquels l'inhibition de la croissance et de la photosynthèse (*cf* Figure 5). La sensibilité au déficit hydrique de tout processus physiologique est liée à la stratégie développée par la plante dans son adaptation à la sécheresse. L'expansion cellulaire est l'un des processus le plus sensible au déficit hydrique. Cependant, cela ne veut pas dire que l'expansion cellulaire subisse une contrainte plus importante que les autres processus affectés. En effet, l'accumulation de solutés permet à la cellule de maintenir son potentiel hydrique et une turgescence positive afin d'autoriser la croissance cellulaire. Favorisée au niveau de la tige et des feuilles en condition normale, l'expansion cellulaire sera stimulée à la racine durant un déficit hydrique chez de nombreuses plantes. Ainsi, un accroissement de l'élongation racinaire couplé à un arrêt de croissance aux parties aériennes est spécifique d'une réponse à un déficit hydrique (Chauvin *et al.*, 2004 ; Pereira *et al.*, 2008).

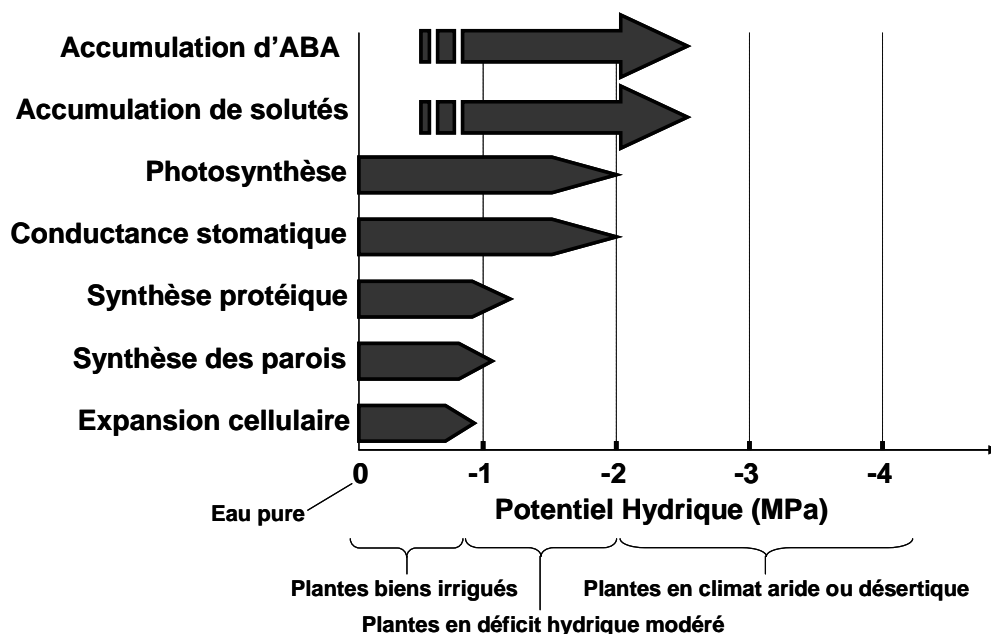


Figure 5 : Modifications physiologiques induits par un déficit hydrique (Hsiao, 1979).

La sécheresse impose ses limites aux processus physiologiques, mais de telles limitations surviennent à des potentiels hydriques variables selon les espèces. Par exemple, pour des plants bien irrigués, le potentiel hydrique des feuilles est généralement compris entre -0,2 MPa et -1 MPa, mais des plants originaires de climats arides peuvent supporter des baisses de potentiel hydrique jusqu'à -10 MPa, voire plus. La capacité à maintenir l'activité physiologique malgré l'insuffisance en eau implique d'investir dans de nombreux changements onéreux pour la plante. Parmi ces changements, l'ajustement osmotique par la synthèse et l'accumulation de solutés compatibles aidant au maintien de la turgescence, ou encore la stimulation de croissance d'organes non-photosynthétiques comme la racine afin d'augmenter sa capacité d'absorption de l'eau. La réponse physiologique à un déficit hydrique est donc un compromis entre les coûts pour maintenir ces mécanismes opérationnels sous contrainte et les bénéfices engendrés par ceux-ci (Chauvin *et al.*, 2004 ; Silva-Robledo *et al.*, 2007 ; Pereira *et al.*, 2008).

• *Implication des aquaporines*

Des protéines trans-membranaires, les aquaporines, permettent le passage sélectif de l'eau à travers la membrane. Elles contribuent au caractère de perméabilité sélective à l'eau de la membrane et participent à la diffusion de l'eau à travers celle-ci. L'eau circulant plus aisément à travers ces canaux plutôt qu'à travers la bicouche lipidique, les aquaporines facilitent ainsi les mouvements d'eau entre cellules (Weig *et al.*, 1997 ; Schäffner *et al.*, 1998 ; Tyerman *et al.*, 1999). La direction et l'amplitude des flux d'eau transitant par les aquaporines dépendent, comme au niveau de la bicouche lipidique, des gradients de potentiels hydriques entre le milieu intracellulaire et son extérieur. Cependant, en réponse à des variations du pH ou de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, les aquaporines peuvent être fermées (Tyerman *et al.*, 2002 ; Tournaire-roux *et al.*, 2003). Cette aptitude suggère que les plantes pourraient réguler la perméabilité membranaire de leurs cellules à l'eau (Mahdiah *et al.*, 2008 ; Sade *et al.*, 2009).

1.3.2. Les mouvements de l'eau chez la plante : la balance hydrique

• *L'eau dans le sol*

La capacité de charge et le degré de liberté de l'eau dans un sol varient en fonction du type de sol et de sa structure (*cf* Tableau 5). Par exemple, le sable possède de grosses particules pouvant largement dépasser le millimètre de diamètre. La surface de contact par

gramme de sol de type sablonneux est relativement faible. Agrégées entre elles, ces grosses particules présentent de larges interstices dans le sol par lesquelles l'eau pourra s'infiltrer. A l'opposé, l'argile est composée de petites particules d'un diamètre inférieur à 2 μm . La surface de contact par gramme de sol est donc importante, ce qui laisse peu d'espace disponible à l'eau entre les particules et rend ce type de sol très compact (Askin et Ozdemir, 2003 ; Fooladmand, 2007).

Tableau 5 : Caractères physiques de différents types de sols.

Type de sols	Diamètre des particules (μm)	Superficie de contact par gramme (m^2)
Sable grossier	2000-200	...
Sable fin	200-20	<1-10
Limon	20-2	10-100
Argile	<2	100-1000

Les particules du sol forment donc des espaces plus ou moins important en fonction de la densité et du diamètre des particules qui le compose. Sous l'effet de la gravité, l'eau de pluie s'infiltré en profondeur par ces interstices, déplaçant ou piégeant l'air qui s'y trouve. L'eau adhère alors aux particules du sol en formant une pellicule qui peut remplir partiellement ou totalement les espaces libres entre particules. Pour un sol sablonneux, les espaces entre particules sont si grands que les molécules d'eau ne sont que faiblement retenues par les particules, et la majeure quantité de l'eau ne fait que traverser le sol. A l'inverse, dans un sol argileux, les particules sont si fines et si compactes qu'elles s'opposent au passage de l'eau. La capacité de rétention de l'eau d'un sol est appelée la capacité au champ. La capacité au champ représente le volume d'eau maximal retenu par les particules d'un type de sol donné saturé en eau, donc, après drainage. Pour exemple, l'argile a la plus grande capacité au champ avec près de 40% du volume d'eau retenu, alors que le sable n'atteint qu'environ 3% de ce volume (Rawls, 1983 ; Fooladmand, 2007).

Le potentiel hydrique du sol est dépendant de deux composantes : la pression osmotique et la pression hydrostatique. Parce que l'eau du sol est généralement pauvre en solutés, la pression osmotique est considérée comme négligeable, à l'exception de cas particuliers comme lors d'un stress salin. La pression hydrostatique, quant à elle, est proche de zéro pour des sols à la capacité au champ. Avec l'assèchement du sol, la pression hydrostatique décroît jusqu'à être fortement négative. Cette pression négative de l'eau dans le sol est la résultante de la disparition de l'eau au profit de l'air dans les interstices du sol.

L'adhésion des molécules d'eau aux particules du sol se renforce avec une interface eau/air qui rend beaucoup plus difficile l'absorption de l'eau par capillarité au niveau de la racine.

L'eau se déplace à travers le sol par flux de masse en suivant les gradients de pression. Ainsi, l'eau se déplace des régions au contenu en eau le plus important vers les régions au contenu en eau le plus faible. L'absorption de l'eau par la racine crée un manque d'eau qui, de fait, abaisse la pression hydrostatique à son voisinage. Un gradient de pression hydrostatique est ainsi créé avec la quantité d'eau environnante. Ce gradient entraîne alors les mouvements d'eau par flux de masse jusqu'à la racine où l'eau sera à nouveau disponible pour les besoins de la plante. La vitesse de déplacement des flux d'eau à travers le sol est fonction à la fois de la magnitude du gradient de pression et de la conductivité hydraulique du sol. Cette dernière est en fait une estimation de la facilité avec laquelle l'eau va pouvoir se déplacer dans le sol. A l'évidence, la conductivité hydraulique dépendra tout autant du type de sol que de la quantité d'eau en présence. Par exemple, le sable montre une conductivité hydraulique très élevée à la différence de celle de l'argile qui est très faible, ceci étant fonction de l'espacement et de la taille des particules qui composent chacun de ces sols. La conductivité hydraulique décroît drastiquement avec la diminution de la quantité d'eau dans le sol. Ce phénomène est expliqué par le fait que l'eau est peu à peu remplacée par l'air aux interstices du sol, n'autorisant les déplacements de l'eau que le long des parois de ces microcavités (Aryal *et al.*, 1999 ; Chakraborty *et al.*, 2006).

Pour des sols très desséchés, le potentiel hydrique peu atteindre des valeurs très basses et franchir un seuil appelé le point de flétrissement permanent. Ce point détermine la valeur du potentiel hydrique du sol pour laquelle la plante ne peut plus regagner une pression de turgescence en excluant théoriquement toute perte hydrique par transpiration. Ceci implique donc que le potentiel hydrique du sol a atteint une valeur proche ou inférieure à la pression osmotique de la plante. Le point de flétrissement permanent varie donc non seulement en fonction du type de sol, mais aussi en fonction de la plante, puisque chaque espèce possède une pression osmotique cellulaire qui lui est propre (Zusevics, 1980 ; Noorbakhsh et Afyuni, 2000 ; Gulser, 2004).

● *La transpiration et la feuille*

Au niveau de la feuille, l'eau est « tirée » hors du xylème vers les parois des cellules du mésophylle où elle va être évaporée. La vapeur d'eau va alors diffuser à travers les cavités de la feuille pour atteindre le pore stomatique par lequel elle pourra s'échapper. Il est nécessaire de préciser que la cire de la cuticule recouvrant la feuille représente un obstacle à

la diffusion de la vapeur d'eau. La perte d'eau au niveau de la cuticule est estimée à seulement 5% de l'ensemble. L'essentiel de la dispersion de l'eau se fera donc par l'intermédiaire des pores stomatiques (Hallam, 1981 ; Steudle, 2002 ; Ristic et Jenks, 2002).

La transpiration au niveau de la feuille est sous contrôle de deux facteurs : la différence de concentration en vapeur d'eau entre l'air des interstices de la feuille et l'air extérieur, et, la résistance de diffusion de la vapeur d'eau au passage du pore stomatique de l'intérieur de la feuille vers l'extérieur. Alors que le volume d'air contenu par les cavités à l'intérieur de la feuille est faible, la surface d'échange y est très importante. Cette surface à partir de laquelle l'eau s'évapore est estimée à près de 7 à 30 fois la surface extérieure de la feuille. Une grande surface humide contenue dans un faible volume entraîne la saturation en vapeur d'eau de l'air qui s'y trouve. Ainsi, l'air des interstices de la feuille est supposé proche du potentiel hydrique d'équilibre avec la surface des parois cellulaires, à partir de laquelle l'eau s'évapore. La concentration de vapeur d'eau varie tout au long du cheminement de la transpiration. La valeur absolue des différences de concentration de vapeur d'eau dirige le flux de transpiration vers l'extérieur et cette valeur dépend grandement de la température foliaire (Meidner, 1975 ; Polyakov et Karpushkin, 1981) (*cf* Tableau 6). Ce gradient de vapeur d'eau entre l'extérieur et l'intérieur de la chambre sous stomatique soutient la transpiration, autorisant l'évaporation de l'eau aux interstices des cellules du mésophylle et maintenant le phénomène de tension-cohésion.

Tableau 6 : Valeurs représentatives de l'humidité relative, du potentiel hydrique et de la concentration en vapeur d'eau absolue à 4 points du trajet de la dissipation de l'eau chez la feuille (Nobel, 1999).

Localisation	Humidité Relative	Vapeur d'eau	
		Concentration (mol.m ⁻³)	Potentiel (MPa)
Chambre sous stomatique (25°C)	0.99	1.27	-1.38
Juste à l'intérieur du pore stomatique (25°C)	0.95	1.21	-7.04
Juste à l'extérieur du pore stomatique (25°C)	0.47	0.60	-103.7
Air ambiant (20°C)	0.50	0.50	-93.6

Int.
Ext.

Le second facteur régissant la perte d'eau à la feuille, soit la résistance de diffusion de la vapeur d'eau aux voies de transpiration, est fonction de deux variables : la résistance stomatique de la feuille liée à la résistance de diffusion aux pores stomatiques, et, la résistance

à la couche limite liée à la résistance de diffusion au travers de la fine couche d'air à la surface foliaire (Ferreira *et al.*, 1994). L'épaisseur de la couche limite est fonction de la vitesse du vent et de la taille de la feuille. Plus l'air entourant la feuille est immobile, plus l'épaisseur de la couche limite est importante et plus il devient difficile à la vapeur d'eau de la traverser. Lorsqu'il n'y a aucun mouvement d'air, une augmentation du degré d'ouverture stomatique n'a que peu d'effet sur le taux de transpiration, alors qu'il peut toujours être réduit par fermeture stomatique. Les mouvements d'air induits par le vent réduisent la quantité d'air de la couche limite et diminuent sa résistance (Silva *et al.*, 1988 ; Martin *et al.*, 1999). Dans ces conditions, la résistance stomatique récupère le contrôle des pertes en eau. De nombreux critères morphologiques et anatomiques de la feuille peuvent influencer sur l'épaisseur de la couche limite, tel que la forme et la taille des feuilles ou encore la présence de duvet à leur surface (Grace *et al.*, 1980 ; Benz et Martin, 2006). Néanmoins, il ne s'agit là que d'adaptation pour réduire un phénomène physique pouvant limiter la transpiration, car la régulation de la transpiration se fait principalement au travers des stomates dont l'état d'ouverture est contrôlé par les cellules de garde.

Comme la cuticule recouvrant la feuille est quasiment imperméable à l'eau, la plupart de la transpiration dépend de la diffusion de la vapeur d'eau à travers les pores stomatiques de la feuille. Les pores stomatiques sont des voies de faible résistance à la diffusion de gaz au travers de l'épiderme et de la cuticule, facilitant le passage de la vapeur d'eau vers l'extérieur. Le contrôle de l'ouverture stomatique par la plante est essentiel pour la régulation de l'absorption du dioxyde de carbone nécessaire à la photosynthèse, et, pour la régulation des pertes en eau. La compétition entre absorption de dioxyde de carbone et perte d'eau représente un défi pour les plantes supérieures, car elles doivent promouvoir la première tout en limitant la seconde (Peisker, 1973; Farquhar *et al.*, 1980 ; Jarvis *et al.*, 1999).

Lorsque l'eau est abondante, la régulation temporelle de l'ouverture stomatique prédomine, *i.e.* l'ouverture de jour et la fermeture de nuit. La demande en CO₂ étant nulle de nuit du fait de l'arrêt de la photosynthèse, les stomates sont fermés pour prévenir toutes pertes d'eau inutile. Par contre, durant la journée, moyennant une irrigation abondante et un fort ensoleillement, l'ouverture stomatique est maximale. Dans ces conditions, l'absorption de CO₂ nécessaire à la photosynthèse stimulant la croissance et la reproduction sera favorisée à la limitation des pertes en eau puisque en abondance. Avec la disparition progressive de l'eau dans le sol, l'ouverture stomatique se réduit, voire se ferme, malgré un fort ensoleillement. Dans de telles conditions, économiser les pertes hydriques devient prioritaire sur l'absorption de CO₂ (Brinker *et al.*, 2001 ; Webb, 2003 ; Hubbard *et al.*, 2007).

La résistance stomatique est fonction du degré d'ouverture des stomates, et cette ouverture stomatique est commandée par une paire de cellules épidermiques spécialisées, les cellules de garde, qui entourent le pore stomatique. Les cellules de garde agissent telles des valves hydrauliques multi sensorielles. Elles modulent l'ouverture stomatique en intégrant la perception de facteurs environnementaux comme l'intensité lumineuse, la température, le statut hydrique et les concentrations intracellulaires en CO₂ (Sheriff, 1979). Par exemple, une lumière appliquée sur des feuilles maintenues dans l'obscurité est perçue par les cellules de garde comme un signal d'ouverture, et une série de réponses va être déclenchée pour aboutir à l'ouverture des stomates. L'une des premières réponses va être l'absorption d'ions intracellulaires et un remaniement métabolique dans les cellules de garde. L'accumulation des ions dans la cellule et la biosynthèse de solutés compatibles abaissent le potentiel osmotique des cellules de garde. La diminution du potentiel osmotique entraîne de facto la réduction du potentiel hydrique et favorise l'entrée d'eau. Cette entrée d'eau augmente la pression de turgescence, et grâce aux propriétés élastiques de leurs parois cellulaires, les cellules de garde peuvent augmenter leur volume et entraîner l'ouverture du pore stomatique (Kubiczek, 1978 ; Dittrich *et al.*, 1979 ; Lu *et al.*, 1995, Lu Ping Outlaw *et al.*, 1997 ; Roelfsema et Hedrich, 2002 ; MacRobbie, 2006).

• *Transport de l'eau de la racine à la feuille*

Dans le sol, l'eau circule par flux de masse jusqu'à la racine. Lorsque l'eau entre en contact avec la surface de la racine, elle pénètre de l'épiderme à l'endoderme par trois voies distinctes : la voie apoplastique, symplastique et transmembranaire (*cf* Figure 6). La voie apoplastique emprunte les espaces pariétaux tel que le système contigu de parois végétales, les espaces intercellulaires, et la lumière de cellules ayant perdu leur cytoplasme comme les fibres et les vaisseaux du xylème. La voie symplastique a recours au réseau de plasmodesmes interconnectant les cytoplasmes des différentes cellules. Aussi bien au niveau de la voie apoplastique que de la voie symplastique, l'eau ne traverse pas de membranes semi-perméables. L'orientation des flux d'eau y est donc régie par le flux de masse, lequel est dépendant des gradients de pression hydrostatique. Enfin, la voie transmembranaire autorise le passage des molécules d'eau de cellule à cellule par les membranes plasmiques. Par cette voie, l'eau doit franchir une membrane semi-perméable à l'entrée et à la sortie de la cellule en suivant le gradient du potentiel hydrique total (Kholodova *et al.*, 1987 ; Steudle et Peterson, 1998). Au niveau de l'endoderme, l'eau circulant par la voie apoplastique va rencontrer un obstacle : la ceinture de Casparie. La ceinture de Casparie est une chaîne de parois de cellules

radiales imprégnées d'une substance hautement hydrophobe : la subérine. La ceinture de Casparie force ainsi le passage de l'eau vers la voie transmembranaire pour traverser l'endoderme et atteindre le xylème. Cependant, l'eau traverse l'endoderme principalement par la voie symplastique. Cette prédominance de la voie symplastique explique la forte influence des aquaporines sur la perméabilité à l'eau de la racine (Enstone *et al.*, 2002 ; Ma et Peterson, 2003). L'inhibition de la famille de gènes codant les aquaporines réduit la conductivité hydraulique de la racine chez des plantes qui fanent facilement (Siefritz *et al.*, 2002) ou des plantes produisant de plus larges systèmes racinaires (Martre *et al.*, 2002).

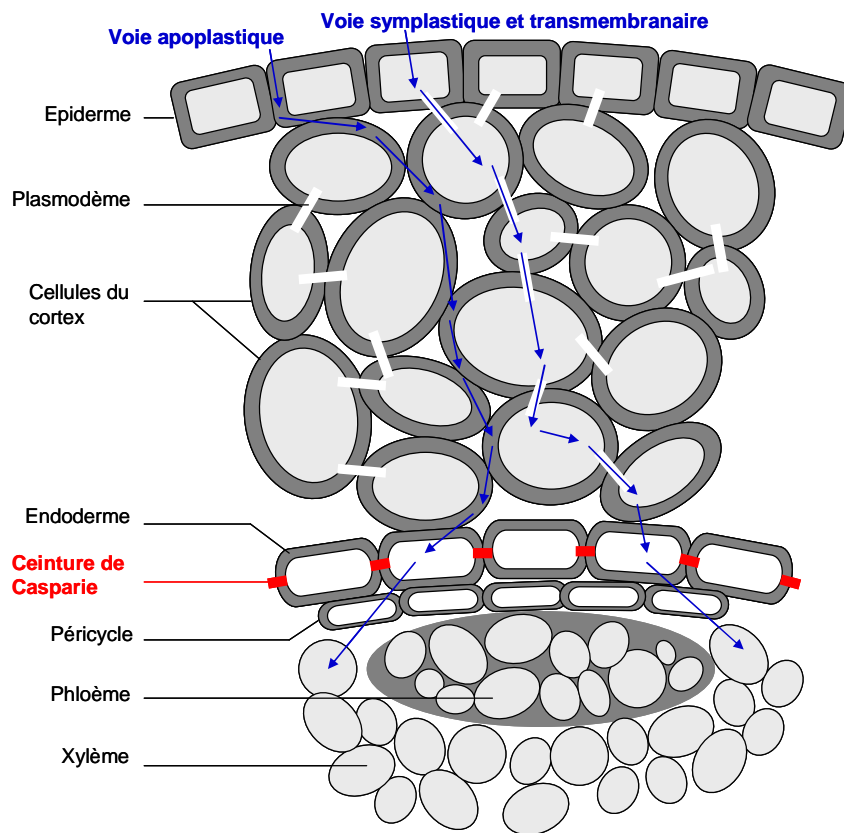


Figure 6 : Coupe schématique d'une racine et des voies de cheminement de l'eau du milieu extérieur aux tissus vasculaires de la racine: la voie apoplastique, la voie symplastique et la voie transmembranaire.

Le xylème est composé de cellules ayant perdu leur contenu cellulaire et où ne subsiste plus que les parois cellulaires lignifiées. Ces parois cellulaires, associées entre elles, forment une tubulure de faible résistance pour le passage de l'eau. Cette propriété abaisse l'amplitude des gradients de pression nécessaires aux mouvements d'eau de la racine aux

feuilles. L'eau peut ainsi circuler à travers le xylème de manière beaucoup plus efficace que si elle devait franchir des cellules vivantes (Pratt *et al.*, 2007 ; Lacointe et Minchin, 2008).

Théoriquement, les gradients de pression nécessaires aux mouvements de l'eau à travers le xylème pourraient être dus à la génération d'un gradient positif à la base et négatif au sommet de la plante. Cependant, même s'il est possible que certaines racines puissent développer des pressions hydrostatiques positives, le gradient de pression est généralement quasi nul au niveau de la racine. A contrario, l'eau aux extrémités aériennes de la plante est soumise à une pression hydrostatique négative et développe une forte tension. Cette tension est le véritable moteur de l'ascension de l'eau. Grâce aux propriétés cohésives de l'eau, la tension est maintenue tout le long du cheminement de l'eau dans le xylème. C'est pour cela que cette théorie a été baptisée tension-cohésion de l'ascension de l'eau (Bonner et Galston, 1952). La pression négative à l'origine de l'ascension de l'eau dans la plante se développe à la surface des barrières cellulaires de la feuille, principalement aux cellules du mésophylle. Les cellules du mésophylle ont la particularité d'être en contact direct avec l'air grâce à de nombreux espaces intercellulaires. Lorsqu'une partie de l'eau recouvrant les parois des cellules du mésophylle est perdue par évaporation dans l'atmosphère, la pellicule d'eau se rétracte aux interstices des parois. Cela crée une tension à l'interface paroi / eau qui génère alors une pression négative au niveau de la phase liquide (Polyakov et Karpushkin, 1981 ; Wei *et al.*, 1999 ; Steudle, 2001 ; Sperry *et al.*, 2003). Le mécanisme de tension-cohésion ne nécessite aucun coût métabolique, cependant, l'énergie qui l'alimente est directement fournie par le soleil. En effet, c'est sous l'action du rayonnement solaire que l'augmentation de température de la feuille et de l'air environnant va induire l'évaporation de l'eau (Steudle, 2002).

• *L'absorption de l'eau par la racine*

L'absorption de l'eau par la racine se fait par un étroit contact avec le substrat, notamment par le chevelu racinaire. Le chevelu racinaire est une microscopique extension des cellules épidermiques de la racine démultipliant la surface d'absorption de l'eau dans le sol. L'eau pénètre plus facilement la racine par ses extrémités, car les régions de la racine plus matures possèdent une couche de tissu protectrice relativement imperméable : l'exoderme. La subérisation des parties les plus anciennes de la racine permet de favoriser l'absorption de l'eau aux régions de la racine qui explorent activement de nouveaux espaces dans le sol. Cela contribue également à renforcer le flux de masse des nutriments au xylème (Zwieniecki *et al.*, 2001 ; Enstone *et al.*, 2002 ; Levin *et al.*, 2007). Le continuum entre le substrat et la racine

permet de faciliter l'absorption de l'eau. C'est pour cette raison que les plants sont plus sensibles au déficit hydrique après un rempotage, car le continuum entre racine et substrat est alors brisé. Il faut alors attendre la croissance de nouvelles racines pour que la plante puisse retrouver le contact avec le substrat et retrouver une meilleure tolérance à un déficit hydrique (Huck, 1984 ; Grossnickle, 2005).

• ***Le continuum sol-plante-atmosphère***

Le cheminement de l'eau à travers la plante depuis le sol jusqu'à l'atmosphère implique différents mécanismes de transport. L'eau circule dans le sol et le xylème par flux de masse suivant les gradients de pression. Au niveau de la feuille, l'eau diffuse sous forme gazeuse et suit un gradient de vapeur la conduisant de la chambre sous stomatique à l'atmosphère. La transpiration génère des pressions négatives au xylème qui sont transmises par capillarité le long des parois cellulaires. Ce phénomène est l'élément clef autorisant le transport de l'eau du sol aux parties aériennes chez les plantes, car l'eau du sol est elle aussi attirée vers la plante par capillarité. La perte d'eau induite par transpiration au niveau de la feuille provoque par capillarité l'absorption de l'eau du sol et les mouvements ascendants de l'eau le long du xylème. Ce mécanisme est totalement régi par des forces physiques et n'implique aucune dépense métabolique. La viabilité de ce système de transport dépend de nombreux éléments permettant de maintenir le continuum par capillarité, tel que la voie de faible résistance du xylème et la filtration de l'eau par la ceinture de Casparie qui empêchent les cavitations, ou encore le déploiement d'une vaste surface racinaire pour la prospection de l'eau (Passioura, 1982 ; Kirkham, 2002 ; Coelho *et al.*, 2003).

1.4. LE DEFICIT HYDRIQUE CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES

Est dit en déficit hydrique tout tissu ou cellule présentant un contenu en eau inférieur à celui qu'il devrait être à l'état hydrique le plus favorable. Lorsque le déficit hydrique se met en place lentement, il autorise des modifications du développement, notamment de la croissance en diminuant, par exemple, l'expansion foliaire.

La tolérance à la dessiccation et le délai de dessiccation doivent être distingués. Le premier désigne l'aptitude de fonctionnement sous déshydratation, et le second, la capacité à maintenir les tissus sous forme hydratés. Parmi les plantes à délai de dessiccation, il y a celles qui sont modérées et celles qui sont fortes consommatrices en eau. Les premières préservent les réserves du sol pour un usage ultérieur, tandis que les secondes puisent intensément l'eau, déployant un système racinaire leur permettant d'aller la recueillir profondément dans le sol. La disponibilité, dépendant du sol et du climat, et l'efficacité d'utilisation de l'eau par la plante déterminent ses exigences. Une plante pouvant capter une plus grande quantité d'eau, ou ayant un meilleur rendement d'utilisation de l'eau, résistera d'autant mieux à un déficit hydrique.

1.4.1. Les différentes stratégies de résistance à la sécheresse

• *Stimulation de la croissance racinaire*

Le développement du système racinaire est également affecté par un déficit hydrique modéré. Le ratio de biomasse entre la partie aérienne et la racine semble être régi par la balance entre l'absorption de l'eau par la racine et la photosynthèse des parties aériennes. A l'évidence, cette balance est renversée avec l'appauvrissement des apports en eau. L'expansion foliaire est inhibée : la part de carbone et d'énergie normalement monopolisée par celle-ci peut être remobilisée pour stimuler la croissance racinaire (Schmidhalter *et al.*, 1998 ; Kondo *et al.*, 2000 ; Zhang et Fu, 2005). Parallèlement, les racelles dans les portions de sol desséchées perdent leur turgescence et favorisent, de fait, la croissance des racelles encore implantées dans les parties humides du sol (Radin *et al.*, 1989). Il est notable que les plants en fructification sont beaucoup plus vulnérables à un stress hydrique. En effet, le fruit et les racines entrent alors en compétition pour la captation des assimilats et de l'eau nécessaire à leur développement respectif, et la croissance racinaire en est d'autant affectée.

● ***Réduction de la surface foliaire et accroissement de la cuticule***

Lorsque la quantité en eau de la plante décroît, les cellules se rétractent et la pression de turgescence contre la paroi cellulaire se relâche. La pression de turgescence étant indispensable à la croissance cellulaire, sa réduction fait que les cellules perdent en volume et entraîne la concentration des solutés : l'expansion cellulaire, et donc la croissance de la plante, est alors stoppée. La diminution de la superficie foliaire rend alors possible la limitation des pertes en eau par transpiration et le rationnement des réserves du sol (Astegiano et Pilatti, 2003 ; Petcu *et al*, 2003). Les plantes modifient leur croissance en réponse au stress par l'ajustement coordonné de nombreux processus tels que la biosynthèse des parois cellulaires et des membranes, la synthèse protéique ou encore la division cellulaire (Bursens *et al.*, 2000).

Une plante ayant développé une superficie foliaire donnée et subissant un déficit hydrique induit la sénescence de ses feuilles, voire leur chute. L'ajustement de la superficie foliaire est un remaniement à long terme améliorant le statut de la plante à un environnement aride. L'abscission foliaire suivant un déficit hydrique est la conséquence de la production d'une phytohormone très volatile : l'éthylène (Gomez-Cadenas *et al.*, 1996 ; Mishra *et al.*, 2008).

Phénomène connu, le déficit hydrique stimule la production d'une cuticule plus épaisse afin de limiter les pertes hydriques engendrées par la transpiration cuticulaire. La cire est produite à la fois à la surface et dans les couches internes de la cuticule (Garrec *et al.*, 1995 ; Jenks *et al.* 2002 ; Samuels *et al.*, 2008). La perméabilité au CO₂ est affectée par ce phénomène, mais les cellules de l'épiderme sous cuticulaire étant non photosynthétiques, son impact sur la photosynthèse reste négligeable. Il faut noter, cependant, que la transpiration cuticulaire ne représente que 5 à 10% de la transpiration totale de la plante. L'accroissement de l'épaisseur cuticulaire ne prend donc son importance que lorsque le stress devient sévère (Boyer *et al.*, 1997 ; Cameron *et al.*, 2006).

● ***Fermeture stomatique : implication de l'acide abscissique (ABA)***

Comme toute hormone, la réponse à l'ABA (ABscisic Acid) est fonction de la sensibilité des tissus et du taux d'ABA produit. La présence de concentrations d'hormones actives dans les tissus aux différentes étapes du développement dépend des processus de biosynthèse, de catabolisme, de compartimentation et de transport.

- Voie de biosynthèse de l'ABA

La biosynthèse de l'ABA a lieu dans les chloroplastes via la voie de biosynthèse des terpénoïdes. La voie de biosynthèse de l'ABA partage un précurseur commun aux voies de biosynthèse des hormones végétales gibbérellines et cytokinines, diphosphate d'isopentényl isomérase (IPP), qui conduit à la synthèse de violaxanthine. La formation de violaxanthine est catalysée par la zéaxanthine époxidase (ZEP) codé par le gène ABA1 chez *Arabidopsis*, ce qui implique indirectement la voie de synthèse des caroténoïdes dans la production de l'ABA (Marin *et al.*, 1996 ; Audran *et al.*, 1998). La violaxanthine est transformée en 9'-*cis*-neoxanthine, qui est alors clivée en xanthoxal (aussi appelé xanthoxine) par la 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygénase (NCED) (Milborrow, 2001). La surexpression de NCED au cours d'un déficit hydrique suggère que cette dernière réaction est une étape clef dans la régulation de la synthèse de l'ABA (Iuchi *et al.*, 2001 ; Yang et Guo, 2007). NCED est codé par une famille de gènes dont l'expression est modulée en fonction du stade de développement de la plante et de la perception de stress environnementaux. Au final, le xanthoxal est converti en ABA par les étapes d'oxydation impliquant l'intermédiaire ABA-aldéhyde. Cette conversion est rendue possible grâce à l'intervention successive de l'enzyme SDR (Short chain Dehydrogenase/Reductase) codé par le gène ABA2 chez *Arabidopsis* et d'un membre de la famille des aldéhydes abscissiques oxydases (AAO) (Cheng *et al.*, 2002 ; Seo *et al.*, 2004) (*cf* Figure 7).

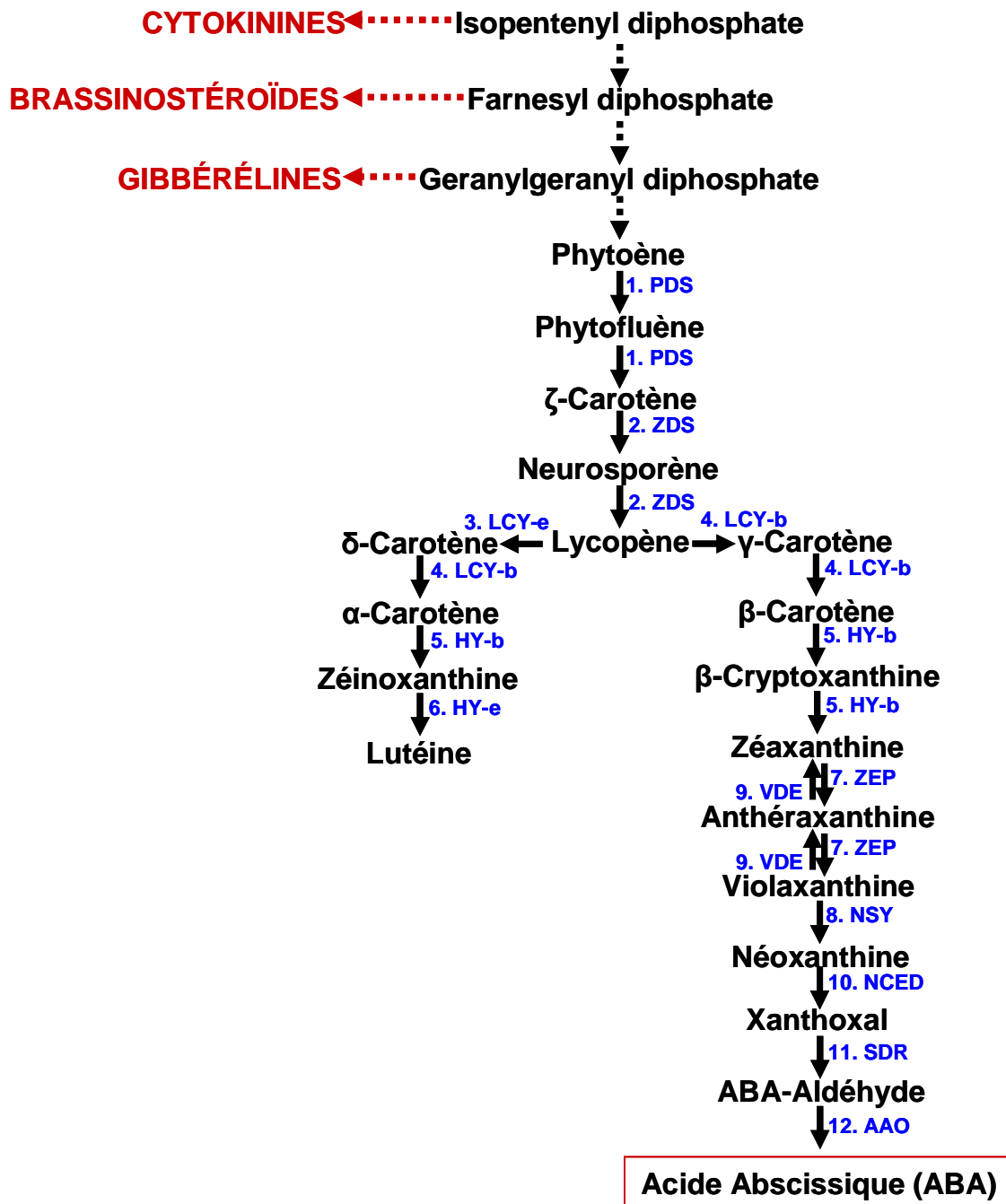


Figure 7 : Voie de biosynthèse des caroténoïdes conduisant à la synthèse d'acide abscissique.

1.PDS : Phytoène Désaturase ; 2. ZDS : ζ-Carotène Désaturase ; 3. LCY-e : Lycopène ε-Cyclase ; 4. LCY-b : Lycopène β-Cyclase ; 5. HY-b : β-Carotène Hydroxylase ; 6. HY-e : ε-Carotène Hydroxylase ; 7. ZEP : Zéaxanthine Epoxidase ; 8. NSY : Néoxanthine Synthétase ; 9. VDE : Violaxanthine De-époxydase ; 10. NCED : 9-cis-époxy Hydroxy Caroténoïde Dioxygénase ; 11. SDR : Short Chain Dehydrogenase/Reductase ; 12. AAO : Aldéhyde Abscissique Oxydase.

- *Transport de l'ABA par le système vasculaire*

L'ABA est transporté à la fois via le xylème et le phloème, cependant, sa concentration est plus importante dans la sève du phloème. L'application d'ABA radioactivement marqué sur les feuilles a permis de suivre son parcours le long des voies vasculaires. L'ABA marqué a ainsi été détecté à la fois dans les parties aériennes et dans la racine, suggérant son transport par le xylème et le phloème (Schurr *et al.*, 1992). Dans les 24 heures suivant son application, la majorité de l'ABA marqué est accumulée au niveau de la racine. La destruction du phloème empêche cette accumulation dans la racine, ce qui indique que l'ABA est transporté jusqu'aux racines via le phloème (Schurr *et al.*, 1992). L'ABA synthétisé par la racine emprunte la voie xylémique pour atteindre les parties aériennes. Cependant, la quantité d'ABA véhiculé par le xylème ou par le phloème peut varier fortement en fonction des conditions environnementales, en particulier lors d'un stress (Schurr *et al.* 1992 ; Zhong *et al.*, 1996 ; Hartung *et al.*, 2002). L'amplitude de cette variation diffère selon les espèces. Par exemple, la concentration xylémique d'ABA de plants de tournesols bien irrigués augmente de 15 nM à 3000 nM lorsque ces mêmes plants sont soumis à un déficit hydrique (Schurr *et al.*, 1992).

- *Rôle de l'ABA dans la signalisation du stress de la racine vers la feuille*

Les prémices d'un déficit hydrique sont détectés par les racines en contact direct avec les zones desséchées du sol. La synthèse d'ABA est alors induite dans les racines. L'ABA produit va ensuite être véhiculé jusqu'aux parties aériennes via le xylème. Ce processus prend place avant que l'abaissement du potentiel hydrique du sol n'entraîne de changements notables du potentiel hydrique foliaires. Ceci suggère que l'ABA, qui contrôle la fermeture stomatique des feuilles, est le signal racinaire permettant de réduire le flux transpiratoire lors d'un déficit hydrique (Davies et Zhang, 1991 ; Triboulot *et al.*, 1996 ; Tallman, 2004 ; Mishra *et al.*, 2006). Cependant, des études utilisant un gène rapporteur ABA-dépendant détectant les concentrations localisées de l'ABA ont démontré que l'ABA induit par un stress s'accumule en premier lieu dans les tissus vasculaires de la feuille et bien plus tard au niveau de la racine et des cellules de garde (Christmann *et al.*, 2005). Le fait qu'il n'y ait pas d'accumulation de l'ABA dans la racine pourrait être expliqué par un transport rapide de l'ABA ou par le transport d'un signal longue distance distinct pouvant même être un précurseur de l'ABA (Schachtman et Goodger, 2008). Tout l'ABA transporté par le xylème ne gagne pas inéluctablement les cellules de garde. En effet, la majorité de l'ABA du flux transpiratoire sera absorbée et métabolisée dans les cellules du mésophylle. Cependant, durant les étapes

précoces du stress, le pH de la sève xylémique augmente (Hartung et Radin, 1989 ; Guo *et al.*, 2004). Son pH s'accroît d'environ 6,3 à 7,2 (Wilkinson et Davies, 1997). Or, la forme dissociée de l'ABA, soit sa forme anionique (ABA^-), s'accumule dans le cytosol des cellules de la plante, plus alcalin que l'apoplasme. L' ABA^- contenu dans le cytosol peut être mobilisé suivant les changements de pH prenant place à travers la membrane. En plus de la compartimentation suivant le pH relatif, des transporteurs spécifiques participent au maintien du faible taux d'ABA apoplastique chez les plantes non stressées. L'alcalinisation de l'apoplasme induite par le stress y favorise la formation d' ABA^- , lequel peut difficilement traverser les membranes. En parallèle, le cytosol s'acidifie avec la déshydratation, ce qui provoque la libération de l'ABA de ses sites de synthèse tout en réduisant son absorption par les cellules du mésophylle. Ces processus, enclenchés lors du stress, permettent d'augmenter la concentration d'ABA apoplastique qui, via le flux transpiratoire, gagne les cellules de garde (Schurr et Gollan, 1990 ; Wilkinson et Davies, 1997 ; Hartung *et al.*, 1998 ; Wilkinson, 1999) (*cf* Figure 8). Il est remarquable que ces processus de redistribution ne nécessitent aucune augmentation de la quantité totale d'ABA. L'augmentation du pH de la sève xylémique pourrait jouer le rôle de signal en provenance des racines afin de promouvoir la fermeture stomatique (Hartung *et al.*, 1990 ; Wilkinson, 1999 ; Guo *et al.*, 2004).

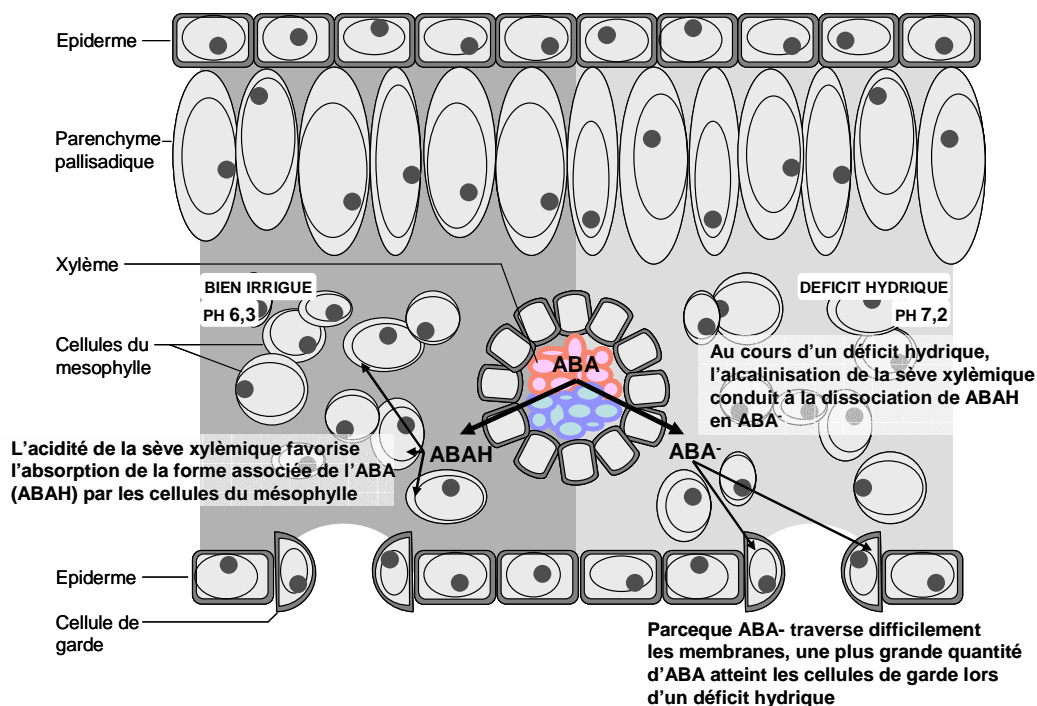


Figure 8 : Redistribution de l'acide abscissique chez la feuille suite à l'alcalinisation de la sève xylémique lors d'un stress hydrique.

- *L'ABA et la fermeture stomatique*

La fermeture des stomates intervient lors d'une déshydratation rapide de la plante. Elle a pour but de limiter la transpiration et, ainsi, de réduire les pertes en eau. La variation de turgescence au niveau des cellules de garde autorise l'ouverture, ou la fermeture, des stomates. Les cellules de garde étant situées sur l'épiderme, la baisse de turgescence peut être la résultante d'une perte directe d'eau sous forme de vapeur dans l'atmosphère (Humbert et Guyot, 1982 ; Roelfsema et Hedrich, 2002 ; Gao *et al.*, 2005). Deux phénomènes sont à distinguer. Tout d'abord, la fermeture stomatique hydro passive, qui intervient lorsque l'hygrométrie de l'air devient très faible. Dans ces conditions, la perte d'eau directe par évaporation au niveau des cellules de garde est trop élevée pour être contre balancée par les apports en provenance des cellules épithéliales adjacentes (Upadhyaya *et al.*, 1988). Ensuite, la fermeture stomatique hydro active, qui est déclenchée lors de la déshydratation des organes telles que la feuille ou les racines (Jodo, 1973 ; Kaiser et Legner, 2007). Ce phénomène dépend de processus métaboliques se déroulant au sein de la cellule de garde : la concentration en soluté de la cellule sera réduite, ce qui augmentera le potentiel osmotique et favorisera la perte d'eau, l'abaissement de la turgescence, et enfin, la fermeture stomatique (Roelfsema et Hedrich, 2002 ; Gao *et al.*, 2005).

L'ABA joue un rôle clef dans la médiation du phénomène de fermeture stomatique hydro active. Constamment synthétisé à un faible taux dans les cellules du mésophylle, l'ABA tend à s'accumuler dans les chloroplastes. Lorsque sont ressentis les premiers effets d'un déficit hydrique par les cellules du mésophylle, l'ABA accumulé jusqu'alors dans les chloroplastes va être libéré dans l'apoplasme (Schurr et Gollan, 1990 ; Wilkinson et Davies, 1997 ; Hartung *et al.* 1998). Dépendant des gradients de pH et de la perméabilité membranaire, l'ABA pourra être remobilisé vers les cellules de garde par le flux de transpiration. Parallèlement, une grande quantité d'ABA est synthétisée puis stockée dans l'apoplasme, appuyant l'effet initié par l'ABA en provenance des chloroplastes. Ainsi, la quantité d'ABA peut s'accroître jusqu'à 50 fois sa concentration dans des feuilles stressées. Cette quantité conséquente d'ABA provenant de la tige agit sur les flux ioniques amenant à la perte de turgescence, et donc, à la fermeture stomatique. Plus en détail, la perte de turgescence conduisant à la fermeture stomatique est induite par un efflux à long terme de potassium (K^+) et d'anion. L'ouverture des canaux sortant à K^+ nécessite une dépolarisation membranaire à long terme, déclenchée à la fois par une dépolarisation transitoire de la membrane plasmique induite par l'ABA et par une vague de calcium cytosolique. Il a été démontré que l'ABA stimulait l'activation des canaux lents anioniques (Wilkinson, 1999 ; Schroeder *et al.* 2001 ;

Roelfsema et Hedrich, 2002 ; Tallman, 2004) et des canaux anioniques rapides (Raschke *et al.*, 2003) dans la cellule de garde. L'ouverture prolongée de ces canaux anioniques autorise la sortie hors de la cellule d'une grande quantité de chlorures (Cl^-) et de malate²⁻, ce qui a pour effet de dépolariser fortement la membrane et d'entraîner l'ouverture des canaux voltage dépendant à efflux de K^+ . Cette dépolarisation est accompagnée par l'inhibition des pompes H^+ ATPase membranaires engendrées par les vagues calciques (Kinoshita *et al.* 1995) sous contrôle de l'ABA et qui renforce la dépolarisation membranaire en inhibant les canaux à influx de K^+ . Ces processus dirigés par l'ABA ont pour conséquence une alcalinisation du cytosol et une augmentation de Ca^{2+} cytosolique (Zhou *et al.*, 2000). Les pompes H^+ ATPase neutralisées, les canaux à influx de K^+ ne peuvent plus s'ouvrir : ce procédé prévient toute ouverture des stomates.

La conductance stomatique est beaucoup plus sensible au statut hydrique du sol qu'à celui de la feuille, suggérant le rôle central du système racinaire dans la perception du stress. De même, il a été démontré que la déshydratation d'une faible portion du système racinaire était suffisante à déclencher la fermeture stomatique. Cela sous-entend l'implication de signaux chimiques, émis à la racine, pouvant influencer sur le degré d'ouverture des stomates au cours d'un déficit hydrique (Schurr et Gollan, 1990 ; Davies *et al.* 2002, Schachtman et Goodger, 2008). Parmi les composés chimiques candidats dans le rôle de transducteur de signal entre la racine et les parties aériennes, on trouve l'ABA (Sauter *et al.* 2001), mais aussi des ions inorganiques agissant par modulation du pH (Wilkinson, 1999 ; Davies *et al.* 2002 ; Guo *et al.*, 2004).

• **Régulation des gènes impliqués dans la tolérance au déficit hydrique : les voies dépendantes et indépendantes de l'acide abscissique**

La transcription est un processus sous contrôle de protéines régulatrices, les facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription peuvent se lier à des séquences géniques spécifiques, dites régulatrices, autorisant un changement de conformation de la molécule d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Ce changement de conformation permet alors de promouvoir la liaison de l'ARN (Acide RiboNucléique) polymérase sur une autre séquence génique spécifique, la séquence promotrice, et d'initier la transcription du gène. Les facteurs de transcription sont eux-mêmes sous contrôle de différentes voies de signalisation induites par les conditions environnementales, tel un déficit hydrique ou un stress salin. De nombreuses séquences régulatrices ont été identifiées pour être impliquées dans des réponses spécifiques à certaines conditions environnementales. Un exemple est donné par le gène

RD29 dont la transcription est promue sous l'effet d'un stress osmotique, d'un stress salin ou de l'ABA (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 1994 ; Stockinger *et al.*, 1997).

Les séquences promotrices régulées par l'ABA possèdent une séquence de six nucléotides spécifiques appelée ABRE pour « ABA Response Element ». Cette séquence consensus C/TACGTGGC appartenant au promoteur permettrait la liaison spécifique de facteurs de transcription sous contrôle de l'ABA et, de facto, de commander la transcription des gènes ABA-dépendants (Hattori *et al.*, 2002 ; Kagaya *et al.*, 2002 ; Kobayashi *et al.*, 2005). La plupart des séquences promotrices des gènes ABA-dépendants arborent aussi un motif CCGAC, appelé séquence DRE pour « Dehydration Response Element » (Kizis et Pages, 2002 ; Narusaka *et al.*, 2003). Celle-ci est reconnue par une autre famille de facteurs de transcription libre de tout contrôle par l'ABA. De fait, l'expression de gènes sous l'emprise d'un stress osmotique est régulée à la fois par une voie de signalisation administrée par l'ABA, la voie dite ABA-dépendante, et par une voie de signalisation autonome, la voie dite ABA-indépendante. Pour chacune d'entre elle, il existe au moins deux voies connues distinctes : deux voies ABA-dépendantes aboutissant soit à la formation du facteur de transcription bzip, soit à la formation de protéines régulatrices du complexe MYC/MYB se liant à l'élément ABRE, et deux voies ABA-indépendantes par des cascades de phosphorylations impliquant les MAP-Kinases et la formation de facteurs de transcriptions issus du complexe DREB/CBF se liant à l'élément DRE (Bellaire *et al.*, 2000 ; Kizis et Pages, 2002 ; Riera *et al.*, 2005 ; Barrero *et al.*, 2006) (*cf* Figure 9).

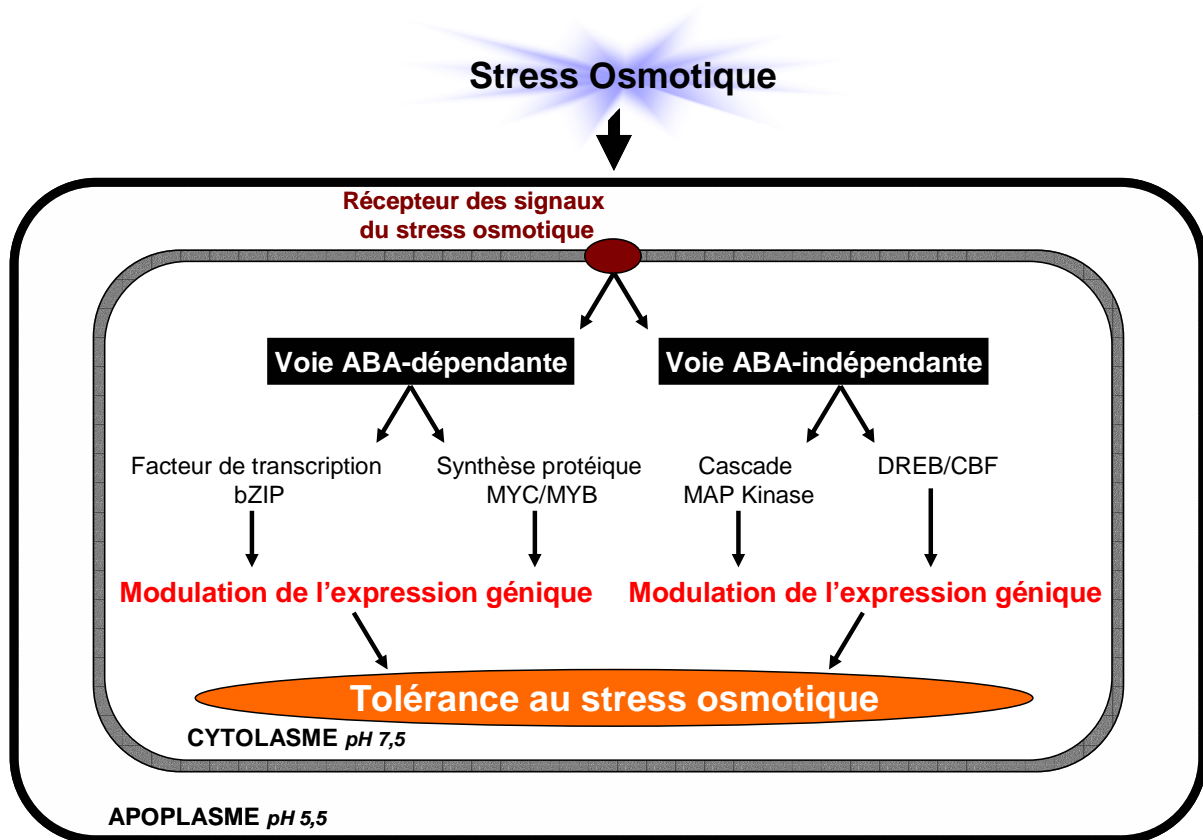


Figure 9 : Voies de signalisation du stress osmotique chez la cellule végétale : la voie ABA-dépendante et la voie ABA-indépendante (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

1.4.2. Maintien de la balance hydrique par ajustement osmotique

• *L'ajustement osmotique des cellules*

Un sol soumis à une longue période de sécheresse voit son potentiel hydrique devenir de plus en plus négatif. Hors, pour que la plante puisse absorber l'eau du sol, il est nécessaire que son potentiel hydrique soit plus négatif que celui du sol. Dans ces conditions, elle va pouvoir abaisser son potentiel hydrique par réajustement osmotique, *i.e.* par une accumulation de solutés au niveau cellulaire. Ce procédé permet de réduire le potentiel hydrique cellulaire tout en maintenant la turgescence cellulaire. Indépendant de la perte volumique cellulaire résultant d'un déficit hydrique, l'ajustement osmotique se définit comme un accroissement net de la concentration en solutés par cellule. Ces solutés peuvent être aussi bien d'origine organique tels les sucres, les acides organiques et les acides aminés, que d'origine inorganique comme les ions, en particulier les ions potassium. Cette accumulation ionique peut fortement déstabiliser les enzymes du cytosol. Il convient donc de prévenir tout contact entre ces ions et les enzymes du cytosol. Pour cette raison, l'accumulation des ions s'opèrera préférentiellement dans la vacuole (Pottosin et Muniz, 2002 ; Neuhaus, 2007). En

contrepartie, et afin de maintenir l'équilibre hydrique intracellulaire, l'accumulation de solutés sera favorisée dans le cytoplasme. La plupart de ces composés organiques accumulés dans le cytoplasme sont appelés solutés compatibles. Les solutes compatibles sont très solubles, n'ont pas de charges nettes et ont une interaction très limitée avec les protéines. Elles permettent de maintenir les protéines dans leur conformation native : en renforçant les forces cohésives de l'eau, les solutés compatibles maintiennent plus longtemps les protéines dans leur forme hydratée (Kurz, 2008). Parmi ces solutés compatibles, on trouve la proline, les glycines bêtaïnes et des sucres alcools tel que le sorbitol ou le mannitol (Bandurska, 2001 ; Shabala et Cuin, 2006).

La quantité d'eau utilisable par la plante, ou réserve utile, dépend de la porosité d'un sol. En effet, seul le volume d'eau disponible dans les interstices du sol pourra être assimilé par les racines. En condition normale, l'eau sera préférentiellement absorbée là où elle se trouve la plus libre, et donc, les petites cavités où elle est fortement liée à la matrice du sol seront évitées. Le réajustement osmotique opérant lors du déficit hydrique permet d'aller puiser ces quelques réserves plus fortement liées au sol. Cependant, le gain supplémentaire en eau reste mineur. A l'instar de la feuille, le réajustement osmotique se produit également à la racine. S'il a les mêmes effets que pour la feuille, le réajustement osmotique au niveau du méristème racinaire permet, par maintien de la turgescence et de l'élongation cellulaire, de réajuster la croissance racinaire en fonction de la présence d'eau dans le sol (Costa et Zoysa, 1995 ; Ogawa et Yamauchi, 2006).

La plante flétrit lorsque la pression de turgescence intracellulaire se rapproche de zéro. Cependant, la plasmolyse n'intervient pas tant que l'accolement de la membrane plasmique à la paroi cellulaire est maintenu par les pressions négatives qui y sont exercées. La perte de volume cellulaire entraîne une déformation mécanique des cellules, mais c'est seulement si l'air pénètre la paroi cellulaire que le protoplaste se contractera indépendamment de la paroi cellulosique (Palta et Lee-Stadelmann, 1983 ; Johnson-Flanagan et. Singh 1986 ; Oparka, *et al.*, 1994).

● *Modification de l'expression génique induite par stress osmotique*

Lors d'un déficit hydrique, l'ajustement osmotique qui en résulte nécessite l'accumulation d'une grande quantité de solutés. Les voies métaboliques à l'origine de ces solutés sont donc activées. De nombreux gènes codant des enzymes impliquées dans l'ajustement osmotique sont sur-exprimés lors d'un stress osmotique. Par exemple, parmi les gènes évoqués, la Pyrroline-5-carboxylate synthétase, un enzyme clef de la voie de

biosynthèse de la proline, la Betaïne aldéhyde déshydrogénase, associé à l'accumulation des glycines bétaines et la *myo*-Inositol 6-*O*-methyltransférase qui contrôle l'accumulation de pinitol, un sucre alcool cyclique (Diaz *et al.*, 1999 ; Buchanan *et al.*, 2000). Les enzymes impliqués dans la biosynthèse des lignines sont aussi sous contrôle du stress osmotique (Narita *et al.*, 2004). L'accroissement de la production en solutés peut aussi bien être le résultat d'une inhibition enzymatique suivant l'exemple du mannitol : en réponse à un stress osmotique, les gènes associés à la dégradation du mannitol dans la production de sucrose sont inhibés (Morton *et al.*, 1985 ; Prata *et al.*, 1997 ; Pharr *et al.*, 1999 ; Therios, 2008).

L'expression de gènes codant des protéines associées au transport membranaire, aux ATPases (Niu *et al.*, 1995) et aux aquaporines (Maggio et Joly, 1995) est aussi modulée par le stress osmotique. De nombreuses autres protéines sont induites lors d'un stress osmotique, notamment des protéases dégradant et recyclant des protéines dénaturées, et, des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité structurelle de la paroi cellulaire tels que la *S*-adénosylméthionine synthétase et les peroxydases (Prata *et al.*, 1997 ; Pharr *et al.*, 1999). Un groupe de gènes, lui aussi contrôlé par le stress osmotique, induit la synthèse de protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) qui sont suspectées de jouer un rôle dans la stabilisation des membranes plasmiques. Bien que leurs fonctions soient très peu connues, les protéines LEA possèdent une très grande affinité aux molécules d'eau et sont accumulées dans les tissus végétatifs lors des épisodes de stress osmotique (Karuna *et al.*, 2003 ; Park *et al.*, 2005 ; Kobayashi *et al.*, 2008 ; Nakayama *et al.*, 2008). L'hypothèse la plus probable serait que leur capacité à fixer l'eau leur permettrait d'éviter la cristallisation de nombreuses protéines cellulaires et de renforcer ainsi la cohésion membranaire (Goyal *et al.*, 2005). Grâce à la technique de puces à ADN (ou microarrays), il a été possible de quantifier que près de 10% de l'expression génique totale du riz était sous contrôle d'un stress osmotique (Kawasaki *et al.*, 2001).

Un stress osmotique entraîne l'accumulation de l'ABA, et, par répercussion, l'accumulation de protéines ABA-dépendantes. Plusieurs études sur des mutants ABA déficients et ABA insensibles ont démontré que l'activation de nombreux gènes imputés au stress osmotique n'était en fait que la conséquence de l'accumulation de l'ABA lors du stress (Grillo *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 2005 ; Yoshida *et al.*, 2006).

1.4.3. Le stress thermique, conséquence du stress hydrique

• *Altération de la dissipation de l'énergie au niveau des feuilles*

Le déficit hydrique limitant la transpiration, la température de la feuille augmente d'autant plus que le mécanisme de refroidissement ralentit. Ceci est à l'origine du lien étroit existant entre déficit hydrique et stress thermique. Maintenir la température foliaire en dessous de celle de l'air ambiant nécessite l'évaporation d'une quantité d'eau considérable. C'est pour cela que tout autre type d'adaptation aidant au refroidissement de la feuille sans affecter les réserves en eau sera privilégié. Ainsi, de petites feuilles diminuant la résistance à l'interface de contact avec l'air leurs permettent de garder une température proche de l'air ambiant, même avec un ralentissement conséquent de la transpiration. Des mouvements foliaires observés lors de déficits hydriques, spécifiques à certaines espèces, autorisent une meilleure évacuation de la chaleur. Ces changements d'angles induits par les mouvements foliaires préviennent de l'exposition aux radiations solaires (Cote, 1995 ; Isoda *et al.*, 1996 ; Raeini-Sarjaz et Chalavi, 2008). L'enroulement foliaire observé chez de nombreuses espèces, dont celles appartenant au genre Citrus, fait parti de ces mouvements d'évitement. Le développement de soies et la production d'une cire réfléchissante à la surface des feuilles sont encore d'autres exemples de stratégies adaptatives limitant les effets des radiations solaires.

• *Vulnérabilité de la photosynthèse aux fortes températures*

La photosynthèse est la réaction prenant place dans les chloroplastes, conduisant à la formation de glucose et d'oxygène à partir d'eau et de dioxyde de carbone. Cette réaction nécessite un apport énergétique pour s'accomplir. Cet apport est fourni par la lumière.

Ayant pour rôle de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique, le système photosynthétique est soumis à un bombardement photonique pouvant être extrêmement dommageable à l'échelle moléculaire, en particulier lors de conditions défavorables. Un excédent d'énergie lumineuse peut amener à la formation de ROS (Reactive Oxygen Species), des dérivés de l'oxygène extrêmement réactifs et labiles tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), l'oxygène singulet ($O^{1/2}$) ou encore le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Réagissant avec tout composé entrant en leur contact, les ROS sont particulièrement nocifs et menacent l'intégrité cellulaire. Le surplus d'énergie lumineuse doit alors être dissipé efficacement pour prévenir toute formation de ROS (Horton *et al.*, 1996 ; Asada, 1999 ; Müller *et al.*, 2001 ; Cao *et al.*, 2004). A cet effet, il existe de nombreux mécanismes impliqués dans la régulation du flux d'énergie des deux photosystèmes afin d'éviter une surexcitation de l'un par rapport à l'autre,

mais sans que cela empêche la formation de ROS résiduels. D'autres mécanismes interviennent alors pour neutraliser ces résidus. Les caroténoïdes, en plus de leur rôle de pigment, modèrent l'état de surexcitation de la chlorophylle et empêchent ainsi la formation d'oxygène singulet résiduel. Les xanthophylles, en particulier la violaxanthine, l'antheraxanthine et la zéaxanthine, permettent elles aussi par un procédé alternatif de convertir rapidement en chaleur l'excès d'énergie et de limiter la surexcitation des antennes chlorophylliennes (Havaux *et al.*, 1996). Une surexcitation du centre réactionnel du PSII (PhotoSystème II), produit par un excès d'énergie lumineuse, entraîne son inactivation et sa dégradation : c'est la photoinhibition (Long *et al.*, 1994 ; Murata *et al.*, 2007 ; Strizh et Neverov, 2007). La photoinhibition est réversible dans un premier temps, mais si elle se prolonge, le centre réactionnel du PSII doit être désassemblé et réparé (Melis, 1999 ; Takahashi et Murata, 2008). En fait, seule la protéine D1 du centre réactionnel est fortement sensible à la surexposition lumineuse et devra être synthétisée de nouveau, alors que les autres constituants du complexe seront recyclés. Le PSI (PhotoSystème I) est lui particulièrement exposé aux ROS. En effet, l'accepteur ferredoxine du PSI est un puissant réducteur interagissant facilement avec l'oxygène et formant un anion superoxyde. Cette réaction entre en compétition avec la réduction du NADP^+ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) ainsi qu'avec d'autres processus de la photosynthèse. L'anion superoxyde, faisant parti de la famille des ROS, peut dénaturer la membrane plasmique en réagissant avec les lipides. Mais compte tenu de la quantité résiduelle produite en condition normale, il peut facilement être éliminé par des enzymes tels que la superoxyde dismutase ou l'ascorbate peroxydase (Asada, 1999 ; Tjus *et al.*, 1999 ; Edreva, 2005).

Au cours de la photosynthèse, la lumière a aussi pour effet de réduire le NADP qui pourra agir comme réducteur dans le cycle de Calvin. Le transfert d'électrons entre la molécule d'eau, réactif de la photosynthèse, et le NADP, va permettre la génération d'un ATP (Adenosine TriPhosphate) qui sera lui-même investi dans le cycle de Calvin. Cette production d'ATP dépendant de la lumière est appelée photophosphorylation (McCabe *et al.*, 1979 ; Shen *et al.*, 1992 ; Schrader *et al.*, 2004).

Lors d'un déficit hydrique modéré, la photosynthèse, moins sensible à l'affaiblissement de la turgescence, est beaucoup moins affectée que l'expansion foliaire. Lorsque le stress devient sévère, la déshydratation atteint les cellules du mésophylle et la quantité d'eau devient alors limitante à l'accomplissement de la photosynthèse. Malgré la diminution de la production en sucres et le ralentissement de l'approvisionnement en assimilats, principalement dû à la perte de turgescence des cellules constituant le phloème,

leur transport ne reste que très peu affectée jusqu'à tard dans l'évolution du stress. Ceci permet à la plante, lors d'un stress sévère, de mobiliser ses réserves et d'en disposer là où elle en nécessite le plus (Wei *et al.*, 2005). Cependant, la photosynthèse est particulièrement sensible à la chaleur. Par exemple, le transport d'électrons au photosystème II, la RUBISCO (RibUlose-1,5-BIS-phosphate CarbOxylase), la NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase et la PEPC (PhosphoEnolPyruvate Carboxylase) sont beaucoup moins stables à de fortes températures pour des espèces non adaptées que des espèces adaptées (Björkman *et al.*, 1980). La température de dénaturation de ces enzymes est bien supérieure aux fortes températures appliquées : les températures appliquées correspondent à une élévation de la température soudaine de 25°C à 40°C maximum (soit +15°C, ce qui est assez rare en condition naturelle) alors que la dénaturation d'une protéine correspond à la désorganisation de sa structure spatiale (sans qu'il y ait rupture des liaisons peptidiques) qui s'effectue par rupture des liaisons hydrogènes à une température avoisinant les 100°C. Ceci suggère que la baisse de photosynthèse enregistrée est plus singulièrement associée aux changements de propriétés des membranes ou au découplage des mécanismes de transfert d'énergie dans le chloroplaste qu'à une dénaturation protéique.

Pour s'accomplir, la photosynthèse nécessite du dioxyde de carbone en plus d'eau et de lumière. Cependant, cette réaction est thermo dépendante, et de ce fait, elle exige un système de régulation performant de la température foliaire. Cette régulation thermique est fournie par le processus de transpiration qui, moyennant une perte en eau, abaisse la température de la feuille exposée à la lumière solaire. Or, perte d'eau et absorption de dioxyde de carbone empruntent la même voie de passage à l'interface air/feuille : le stomate. Le contrôle du degré d'ouverture des stomates par les cellules de garde rend donc inter-dépendant deux phénomènes distincts, l'absorption de CO₂ et la perte de H₂O par transpiration (Shen et Yu, 1997 ; Veste *et al.*, 2000).

L'absorption d'énergie solaire par la feuille est conséquente, ce qui a pour effet d'élever la température foliaire. Cette hausse de température sera dissipée par 3 phénomènes. En premier lieu, l'émission de radiation thermique dans l'atmosphère relative à tout objet soumis à une élévation de sa température. Deuxièmement, les mouvements d'air autour de la feuille permettant d'évacuer l'eau évaporée issue de la transpiration. Enfin, l'évaporation de l'eau elle-même résultant de la transpiration. Les deux derniers phénomènes cités sont les plus importants à prendre en compte.

Les réponses à la température sont complexes, car la température affecte toutes les réactions biochimiques de la photosynthèse, pouvant même affecter l'intégrité des membranes

plasmiques chloroplastiques. Par exemple, l'élévation de la température peut altérer la chaîne d'électron impliquée dans la photosynthèse ou encore entraîner une perte d'affinité de la RUBISCO pour le CO₂ (Crafts-Brandner et Law, 2000 ; Salvucci et Crafts-Brandner, 2004 ; Kim et Portis, 2005).

• ***Modification de la stabilité membranaire sous haute température***

La stabilité membranaire des cellules est primordiale dans la résistance à de fortes chaleurs. Une trop grande fluidité des lipides membranaires à de fortes températures est associée à une perte de fonctions physiologiques. Des mutants d'*Arabidopsis thaliana* fortement dépourvus d'acide gras oméga 3 désaturase, un enzyme qui participe à la synthèse d'acide gras insaturés formant la bicouche lipidique des membranes plasmiques, ont montré une activité photosynthétique d'une meilleure thermo tolérance, ceci étant certainement dû à un plus fort degré de saturation des lipides des membranes chloroplastiques (Iba *et al.*, 1993).

Un accroissement de température réduit la force des liaisons hydrogènes et l'interaction hydrostatiques entre les groupes polaires de la membrane plasmique et les protéines associées de la phase aqueuse (cytoplasme). La structure et la composition membranaire sont donc modifiées par de fortes températures, ce qui peut avoir pour conséquence une fuite dramatique des ions hors de la cellule. La déstabilisation des membranes peut provoquer l'arrêt de la photosynthèse ou de la respiration car ces processus sont dépendants d'activités protéiques ou de transferts d'électrons associées à la membrane (Havaux *et al.*, 1996 ; Zaharieva *et al.*, 1998 ; Vani *et al.*, 2001 ; Ristic *et al.*, 2007).

• ***Synthèse de protéines protectrices***

Une élévation de température de 5 à 10°C au dessus des moyennes peut interférer sur la structure conformationnelle des protéines. Les protéines ainsi modifiées peuvent alors s'aggréger et précipiter, perturbant sérieusement le fonctionnement cellulaire. Afin de se prémunir de ces effets, la plante produit une famille spécifique de molécules appelées HSPs (Heat Shock Proteins). Ces molécules agissent en tant que protéines chaperonnes et permettent de neutraliser les protéines défailantes: le rôle de ces protéines chaperonnes est de prévenir les dommages potentiellement causés par une perte de fonction protéique, due à un mauvais repliement tridimensionnel ou à une dénaturation, en assurant un repliement tridimensionnel adéquat de la protéine. La synthèse des protéines HSPs n'est pas seulement induite par un choc thermique, mais aussi par un large spectre d'évènements incluant le

déficit hydrique, le stress salin, les blessures, les basses températures et des traitements à l'ABA (Gulli *et al.*, 2005 ; Timperio *et al.*, 2008 ; Huang, 2008 ; Sato et Yokoya, 2008).

1.5. LE STRESS SALIN CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES

Naturellement exposées, les plantes aux abords des côtes et estuaires doivent faire face à une contrainte saline d'origine marine. Le reflux des marées, associé aux vents, dissémine les embruns chargés en sel à l'intérieur des terres (Erstad, 1994). Loin du littoral, des résurgences salines peuvent accroître la salinité des sols et limiter toute expansion de la flore. Cependant, le véritable problème provient de l'agriculture intensive. L'utilisation excessive d'engrais riches en solutés et la mauvaise gestion de l'eau d'irrigation ont conduit à un accroissement considérable de la salinité des sols cultivés. Cette concentration des sels dans les sols peut facilement atteindre des niveaux nocifs pour les espèces cultivées. Il est notable que compte tenu de la fragilité des ressources en eau, la qualité des eaux d'irrigation des zones arides et semi-arides est souvent pauvre (*cf* §1.2).

La salinité de l'eau peut être estimée à sa conductivité électrique. En effet, l'eau ne tient ses capacités de conducteur que par les ions dissous qu'elle contient. Sa concentration en ions est d'autant plus forte que sa conductivité est élevée. Mesurée au champ, la conductivité de l'eau d'irrigation est corrélée au potentiel osmotique. Ainsi, de fortes concentrations en sels augmentent la conductivité électrique de l'eau du sol et abaissent son potentiel osmotique.

1.5.1. Diversité adaptative des plantes à un environnement salin

La salinité altère de nombreuses fonctions chez les plantes, ce qui affecte leur croissance et leur développement. Cependant, suivant leur réponse à de très fortes concentrations en sel, il est possible de distinguer deux catégories de plantes. Les halophytes, adaptés aux sols salins, et les glycophytes (ou non halophytes), incapables de tolérer des niveaux en sels équivalents aux halophytes (Abdelly *et al.*, 1995 ; Malcolm *et al.*, 2003 ; Radyukina *et al.*, 2007). La plupart des espèces cultivées sont sensibles à la salinité, tel que le maïs, l'oignon, le riz, le haricot, la laitue et plus particulièrement les agrumes. L'orge et le cotonnier sont connus comme étant modérément tolérants alors que la canne à sucre et le dattier présentent une meilleure tolérance (Greenway et Munns, 1980 ; Katerji *et al.*, 2000). Ces comportements variés témoignent de la stratégie adaptative développée pour répondre aux contraintes environnementales d'un milieu déterminé. Ceci résulte d'une variabilité génétique à la tolérance au stress salin acquise au cours de l'évolution.

1.5.2. Les effets nocifs du stress salin

- *Une similarité avec le déficit hydrique : le stress osmotique*

La présence de solutés dans la zone racinaire abaisse le potentiel osmotique (plus négatif), ce qui réduit le potentiel hydrique du sol. La balance hydrique de la plante entière en est affectée. Le maintien d'un gradient de potentiel hydrique est nécessaire aux mouvements d'eau du sol vers la feuille. Un potentiel hydrique plus faible doit alors être établi pour assurer la continuité du transport de l'eau des racines jusqu'aux feuilles. Cet effet osmotique induit par la présence de solutés est similaire à celui induit par le déficit hydrique. Cependant, une différence essentielle existe entre l'effet induit par un stress salin et un déficit hydrique : la quantité totale en eau disponible. Lors d'un déficit hydrique, l'assèchement du sol ne permet à la plante que de prélever une quantité finie d'eau disponible suivant le profil du sol, diminuant son potentiel hydrique. A l'inverse, lors d'un stress salin, une grande quantité d'eau est généralement disponible, mais à un faible potentiel hydrique. De fait, la plante peut assurer sa croissance, bien que ralentie, sous contrainte saline par ajustement osmotique : la turgescence est maintenue malgré le fléchissement de la croissance cellulaire et le potentiel hydrique est abaissé pour faciliter l'absorption d'eau à la racine (Campos et Assuncao, 1990 ; Munns, 2002 ; Ma *et al.*, 2008 ; Kaviani, 2008). Pour une raison encore à élucider, la croissance suivant un réajustement osmotique est ralenti indépendamment de l'état de turgescence cellulaire (Bressan *et al.*, 1990).

- *La toxicité ionique*

Parallèlement aux effets du stress osmotique, l'élévation des concentrations d'ions spécifiques, particulièrement les ions sodium (Na^+), chlorure (Cl^-) ou sulfate (SO_4^{2-}), peuvent atteindre des niveaux toxiques dans les cellules. En condition normale, pour des cellules de plantes supérieures, les concentrations en ion du cytosol sont maintenues à des niveaux favorisant l'optimum opérationnel du fonctionnement enzymatique, *i.e.* à des concentrations de 100 mM pour le K^+ et à moins de 10 mM pour le Na^+ . De fortes concentrations ioniques ou une déstabilisation du rapport entre K^+ et Na^+ du cytosol conduisent à une inhibition de l'activité enzymatique qui dépend du pH et, pour de nombreuses enzymes, du K^+ . En effet, la forte présence de Na^+ dans le cytosol entraîne une modification du pH intracellulaire qui s'éloigne alors du pH 7,2 de l'optimum réactionnel des enzymes cytosoliques. De plus, le K^+ étant un cofacteur réactionnel important pour de nombreuses enzymes, le Na^+ entre en compétition avec le K^+ sur ses sites de liaison aux enzymes et bloque les réactions

enzymatiques. La synthèse protéique, nécessaire au bon fonctionnement de la machinerie cellulaire, est alors altérée (Pakendorf *et al.*, 1973 ; Lapina *et al.*, 1983 ; Salama *et al.*, 2002 ; Kamel et El-Tayeb, 2004 ; Yagmur *et al.*, 2006). Des enzymes isolées à partir de plantes halophytes ont présenté la même sensibilité au NaCl que des enzymes issus de plantes glycophytes. Le métabolisme des plantes halophytes n'est donc pas plus tolérant à la contrainte saline que celui des plantes glycophytes, suggérant l'implication de processus plus efficient quant à l'isolement des ions excédentaires chez les halophytes (Thiyagarajah *et al.*, 1996). A de fortes concentrations, le Na^+ peut remplacer le Ca^{2+} , ce qui a pour effet de changer la perméabilité membranaire. Cette modification de perméabilité est suivie par une fuite du K^+ cellulaire (Cramer *et al.*, 1985 ; Qian et Liu, 1995 ; Zhan *et al.*, 1999). Le Na^+ entre aussi en compétition avec le K^+ dans de nombreux processus, tels que sa liaison aux sites de fixation spécifique ou son transport. Le Na^+ modifie ainsi toute l'homéostasie ionique et affecte l'absorption des nutriments vitaux pour la plante (FangQing et ZhangCheng, 1999 ; Qi et Spalding, 2004). Au niveau du chloroplaste, la photosynthèse est stoppée sous l'effet d'une forte accumulation de Na^+ ou de Cl^- . Cet arrêt est moins imputable à une déstabilisation de la chaîne d'électron, plutôt très peu sensibles à ces ions, qu'à une déstabilisation du métabolisme du carbone ou de la phosphorylation (Sharma et Hall, 1991 ; Hernandez *et al.*, 1995 ; Yamane *et al.*, 2004 ; Ren et Gao, 2008).

1.5.3. Les stratégies d'acclimatation au stress salin

Lors de la présence de sels dans l'environnement racinaire, le premier signal perçu au niveau de la racine est celui d'une baisse de la disponibilité en eau. Les premières réponses sont donc celles de la perception d'un déficit hydrique. Les plantes tentent alors de minimiser leurs dommages en réduisant l'exposition du méristème aux sels, en particuliers aux parties aériennes en croissance et en pleine activité photosynthétique (Campos et Assuncao, 1990 ; Munns, 2002 ; Ren et Gao, 2008).

Au niveau du xylème, la ceinture de Casparie des cellules endodermiques des racines impose une restriction de mouvement aux ions. Pour passer la barrière de la ceinture de Casparie, les ions doivent passer de la voie apoplastique à la voie symplastique, et donc passer les membranes, pour circuler à travers l'endoderme. Ce passage obligé des ions par la voie symplastique autorise les cellules à restreindre leur passage au xylème au travers de l'action de transports actifs, les excluant partiellement du courant transpiratoire. Dû à l'existence d'un gradient de potentiel électro-chimique favorable, le Na^+ pénètre passivement

dans les cellules de la racine. De fait, l'exclusion du Na^+ à un coût énergétique et doit être reflué vers l'apoplasme par transport actif (Niu *et al.*, 1995 ; Karahara *et al.*, 2004 ; Peng *et al.*, 2004). A l'inverse, le potentiel négatif de la membrane plasmique limite le passage du Cl^- . Les ions réussissant à joindre le xylème sont alors véhiculés par la sève jusqu'aux parties aériennes grâce à la force motrice engendrée par la transpiration. Au cours de son trajet de la racine vers la feuille, la sève peut être partiellement allégée de sa charge en ions. En effet, les cellules adjacentes aux voies de vascularisation peuvent absorber une partie de ces ions et permettre ainsi de limiter leur accumulation dans les feuilles.

Afin de faire face au stress osmotique engendré par le stress salin, comme lors du déficit hydrique, la plante va ajuster son potentiel hydrique en modifiant les concentrations en solutés dans la cellule. Les ions potentiellement toxiques seront internalisés dans la vacuole tandis que les solutés compatibles synthétisés seront accumulés dans le cytosol. Cet ajustement osmotique est nécessaire à toute croissance dans un environnement salin et permet d'accroître la résistance aux ions hyper osmotiques (Xia *et al.*, 1999 ; Gao *et al.*, 2007). Alors que l'ajustement osmotique existe aussi bien chez les glycophytes que chez les halophytes, il semble être plus efficace chez ces derniers (Radyukina *et al.*, 2007). Les principaux solutés compatibles organiques comprennent la glycine bêtaïne, la proline, le sorbitol, le mannitol, le pinitol et le sucrose, alors que le K^+ représente à lui seul la majorité des solutés compatibles inorganiques. La plupart de ces solutés ont une fonction osmoprotectante leur permettant de protéger la cellule de produits résiduels toxiques issus du stress ionique ou osmotique (Matsumura *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 2004 ; Heidari et Mesri, 2008). Avec l'ajustement osmotique, de nombreux effets d'acclimatation au stress salin sont comparables à ceux observés lors d'un déficit hydrique, comme, par exemple, la réduction de la surface foliaire ou l'abscission. De même, la plupart des modifications d'expression génique constatées au cours d'un stress osmotique sont partagées avec celles observées lors d'un stress salin. Les gènes codant les protéines de la réparation ou de la protection cellulaire sont particulièrement concernés. Cependant, à la différence du stress osmotique, le stress salin génère aussi de fortes concentrations ioniques intracellulaires. Cette particularité requiert une réponse spécifique conduite par l'expression de gènes sous contrôle du stress salin (Kalifa *et al.*, 2004 ; Jang *et al.*, 2004 ; Andjelkovic et Thompson, 2006 ; Agarwal, 2008).

1.5.4. Exclusion et compartimentation des ions toxiques

L'accumulation des ions au niveau intracellulaire est une des stratégies de lutte privilégiée face au stress salin à la fois par les halophytes et les glycophytes, car ces mêmes ions seront utilisés dans l'ajustement osmotique requis pour toute croissance cellulaire (Hasegawa *et al.*, 2000). De fortes concentrations ioniques altèrent le métabolisme des plantes. Par conséquent, aussi bien les halophytes que les glycophytes s'efforcent d'évacuer le maximum d'ions excédentaires de leur cytosol, que ce soit vers la vacuole ou vers l'apoplasme (Lapina *et al.*, 1980 ; Radyukina *et al.*, 2007).

La plante serait capable de détecter à la fois l'hyperosmolarité et l'excès d'ions, ce qui lui permettrait de déclencher les mécanismes de réponses appropriés, comme par exemple la régulation des transporteurs ioniques impliqués dans l'ajustement osmotique ou la compartimentation ionique. Il en va de même pour les lipides membranaires jouant le rôle de barrière aussi bien pour les ions que pour les solutés.

Le potentiel électrochimique de la membrane plasmique facilite l'accumulation de Na^+ de l'ordre de 100 à 1000 fois la concentration externe. Cependant, le Na^+ est incapable de traverser la bicouche lipidique par lui-même. Il nécessite, pour cela, d'emprunter les voies normalement dévolues à l'entrée du K^+ , *i.e.* les canaux à faible et à haute affinité au K^+ . Des mécanismes de réponse seront enclenchés au niveau cellulaire. Ainsi, le Ca^{2+} facilitera l'entrée du K^+ en activant les systèmes d'efflux à Na^+ vers l'apoplasme tout en inhibant les canaux autorisant son entrée dans la cellule. Parmi ces canaux à flux passif inhibés par le Ca^{2+} , il y a les canaux non sélectifs, ou encore les canaux voltage-indépendant cationiques, responsables, lorsqu'ils sont ouverts, de l'accumulation d'une grande quantité de Na^+ (Rausch *et al.*, 1996 ; Rus *et al.*, 2001 ; Kabaa et Kobus, 2005). De plus, la cellule est équipée de systèmes de transports spécifiques et spécialisés dans l'absorption du Na^+ , parmi lesquels le HKT, un antiport Na^+/H^+ Ca^{2+} indépendant, qui peut favoriser l'entrée d'une grande quantité de Na^+ dans le cytosol (Rus *et al.*, 2001 ; Davenport *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2008).

Les H^+ ATPases de type P à la surface membranaire établissent un gradient de protons (H^+) entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Ce gradient de H^+ est à l'origine de la force proto-motrice supportant les transports actifs des ions à l'encontre de leur gradient de diffusion. Parmi ces transporteurs trans-membranaires, le SOS1 (Salt Overly Sensitive) est un antiport expulsant un Na^+ moyennant l'entrée d'un H^+ dans la cellule. Il est activé par de fortes concentrations en NaCl via la voie de signalisation Ca^{2+} dépendante SOS. Le Ca^{2+} se lie au SOS3 qui active alors le SOS2, une sérine/thréonine kinase phosphorylant et activant

l'antiport Na^+/H^+ SOS1 (cf Figure 10). Par ce système de régulation de l'influx et de l'efflux, le flux net de Na^+ à travers la membrane plasmique reste sous contrôle (Zhu, 2002 ; Qi et Spalding, 2004 ; Mahajan *et al.*, 2008). L'efflux de Na^+ semble être le point critique de la tolérance au stress salin : des plantes transgéniques surexprimant le gène codant pour l'antiport SOS1 sont plus tolérantes à un stress salin. Equivalentes aux H^+ ATPases de type P de la membrane plasmique mais au tonoplaste, les H^+ ATPases de type V et les H^+ pyrophosphatases assurent le maintien de la force proto-motrice entre le cytosol et la vacuole, et ainsi, supportent l'entrée des ions dans la vacuole (Lv *et al.*, 2008). Utilisant cette force protomotrice, des antiports cation/ H^+ tel que le AtNHX vont faciliter l'influx de Na^+ dans la vacuole. Des plants transgéniques d'*Arabidopsis* et de tomates surexprimant le gène codant l'antiport vacuolaire AtNHX ont montré une meilleure tolérance au stress salin (Apse *et al.*, 1999; Quintero *et al.*, 2000 ; Zhao *et al.*, 2008 ; Soliman *et al.*, 2009). Quant aux Cl^- , il n'a pas encore été bien défini si leur internalisation dans la vacuole s'effectuait de manière passive ou active.

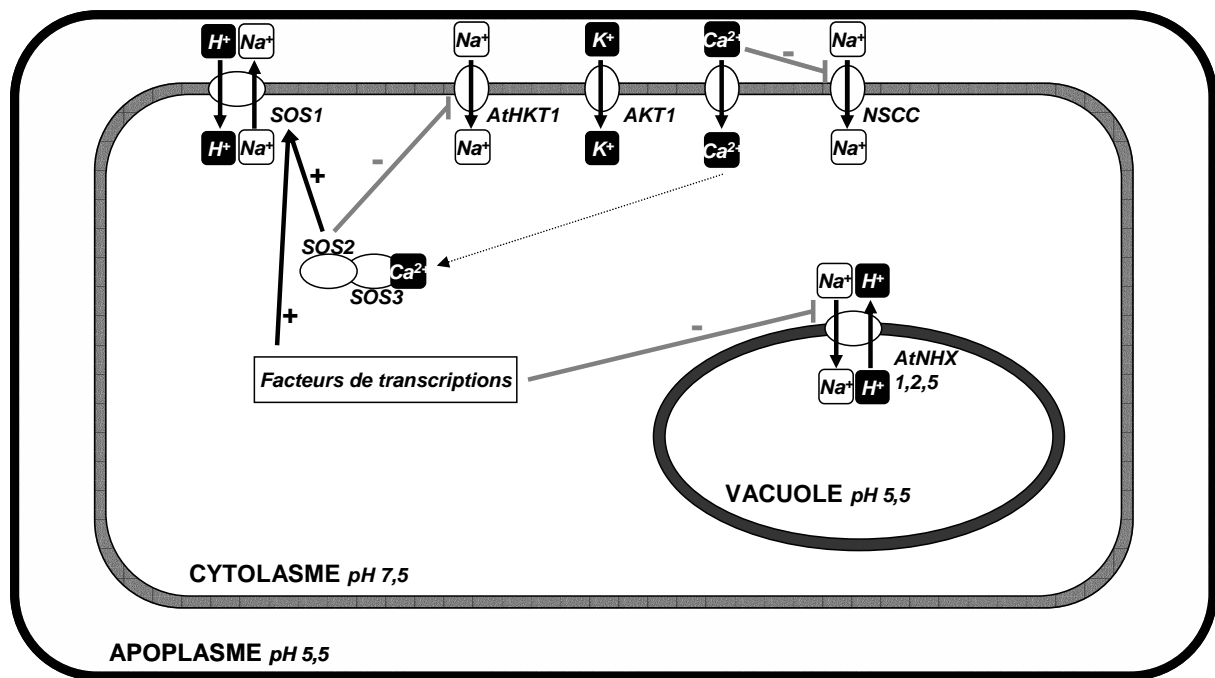


Figure 10 : Régulation de l'homéostasie ionique par la voie SOS-dépendante (Zhu, 2002).

Les plantes sensibles au sel tolèrent un stress salin modéré, principalement grâce aux mécanismes qui restreignent le passage des ions toxiques par la racine. A contrario, les halophytes ont généralement une grande capacité d'accumulation de ces ions au niveau de leurs parties aériennes (Parks *et al.*, 2002). En effet, les halophytes possèdent des feuilles dont

les cellules sont équipées de vacuoles d'une grande capacité d'internalisation pour ces ions. Ces plantes limitent avec plus de force le flux net entrant de Na^+ dans le cytoplasme, leur permettant ainsi de tolérer une charge plus importante de sels dans la sève.

La restriction d'accès des sels au xylème de la racine est un processus beaucoup moins important pour les halophytes que les glycophytes (Ownbey et Mahall, 1983). Cependant, aussi bien pour les uns que pour les autres, la tolérance au stress salin dépendra avant tout de leur capacité à isoler les ions toxiques loin du cytosol, que ce soit par reflux vers l'apoplasme ou par internalisation dans la vacuole (Radyukina *et al.*, 2007). A cet effet, les différents transporteurs, qu'ils soient actifs ou passifs, jouent un rôle primordial dans le développement de la tolérance au stress salin.

Les plantes adaptées aux milieux salins, les halophytes, ont généralement des cellules à faible potentiel osmotique. Un faible potentiel osmotique permet aux cellules de ces plantes d'abaisser suffisamment leur potentiel hydrique, et, d'autoriser l'absorption d'eau à partir d'eau saumâtre en minimisant l'absorption des sels (Balnokin *et al.*, 2005 ; Koyro *et al.*, 2006).

1.6. LES AGRUMES

1.6.1. Taxonomie

La terminologie « agrumes » regroupe les espèces du genre *Citrus* associées à deux genres voisins, *Fortunella* et *Poncirus*. Les espèces de ces trois genres sont sexuellement compatibles. Le terme « agrumes » est employé aussi bien pour désigner les arbres que leurs fruits. Les genres *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella* appartiennent à la famille des *Rutaceae*, à la sous-famille des *Aurantioideae*, à la tribu des *Citreae* et à la sous-tribu des *Citrinae* (Praloran, 1971).

Il existe deux systèmes de classification pour le genre *Citrus*. La classification de Tanaka (1961) tient compte de la multiplication classique par semis des individus et, du fait de la polyembryonie (apomixie partielle), hisse de nombreux hybrides intra ou interspécifiques au rang d'espèce. Tanaka dénombre ainsi près de 156 espèces, alors que la seconde classification établie par Swingle et Reece (1967) n'en compte que 16 (cf Figure 11). En se référant à la classification de Tanaka, il existe huit espèces cultivées : les limettiers *C. aurantifolia* (Christm.) ; les bigaradiers *C. aurantium* (L.) ; les citronniers *C. limon* (L.) Burm. ; les pamplemoussiers *C. maxima* (Burm.) Merr. ; les cédratiers *C. medica* L. ; les pomelos *C. paradisi* Macf. ; les mandariniers *C. reticulata* Blanco et les orangers *C. sinensis* (L.) Osb.

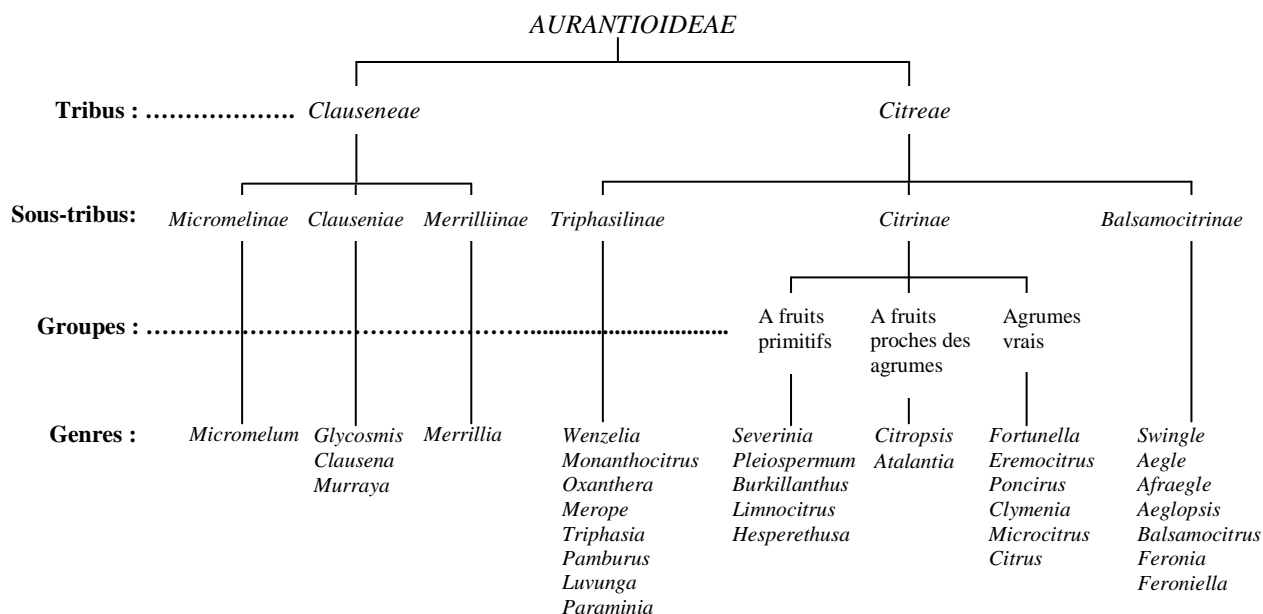


Figure 11 : Taxonomie des *Aurantioideae* (Swingle et Reece, 1967).

Quatre à cinq espèces ont été répertoriées comme appartenant au genre *Fortunella*. Ces espèces, aussi communément appelées kumquats, produisent des fruits de petits calibres appréciés dans la confection de fruits confits. Les arbres sont aussi utilisés en ornementation.

Poncirus trifoliata est l'unique espèce représentative du genre *Poncirus*. Pour cela, le genre *Poncirus* est dit mono-spécifique. *Poncirus trifoliata* se distingue de toutes les autres espèces d'agrumes par ses feuilles caduques et trifoliolées. Résistante au froid et produisant des fruits impropres à la consommation, cette espèce est plus particulièrement employée comme porte-greffe.

1.6.2. Histoire et Economie

Originaire du sud-est asiatique, les agrumes ont été disséminés sur tout le pourtour du globe jusqu'à leur limite d'expansion, *i.e.* du 40^{ème} parallèle nord au 40^{ème} parallèle sud. Reconnus pour leur qualité nutritionnelle et gustative, ils ont été répandus par des hommes en quête de nouveaux espaces. Ainsi, Christophe Colomb emporta avec lui des citrons lors de son voyage vers le nouveau monde, alors seul remède connu contre le scorbut avec l'oignon. Ceci contribua à l'expansion des agrumes par delà l'océan Atlantique. Un siècle plus tard, le commerce international des agrumes frais émergea, avec déjà un rôle prépondérant de l'Espagne comme fournisseur de la quasi-totalité des importations d'agrumes de la France, de l'Allemagne et du Royaume-Uni. Le commerce du jus d'orange ne vint que beaucoup plus tard, avec l'avènement des techniques de transformation après la seconde guerre mondiale.

De nos jours, la superficie des cultures agrumicoles est estimée à plus de 3 millions d'hectares. Avec une production avoisinant les 105 millions de tonnes en 2004 représentant près de 27% de la production fruitière mondiale, la production agrumicole implique de nombreuses nations et représente un enjeu économique d'envergure. La production d'oranges est la plus importante avec 67% de la production totale, suivie par les petits agrumes de types mandarines, puis les citrons et limes, et enfin les pomélos avec respectivement 16%, 10% et 7%. En 2004, près de 140 pays étaient producteurs d'agrumes, mais l'essentiel de la production restait concentrée dans certaines zones géographiques. Les territoires de l'hémisphère nord regroupent près de 70% de la production mondiale avec les Etats-Unis (14%), la Chine (12%) et les pays du pourtour méditerranéen (15%). Néanmoins, le premier producteur mondial, le Brésil, se trouve dans l'hémisphère sud et représente à lui seul 20% de la production mondiale (*cf* Tableau 7) (sources FAO. Disponible sur : <http://www.unctad.org/infocomm/francais/orange/marche.htm>).

Tableau 7 : Production mondiale d'agrumes par pays de 2001 à 2005 (source : Bulletin 2006 de la FAO sur la production des agrumes frais).

	2001-2002	2002-2003	2003-2004	2004-2005
Monde	94092	93032	99133	92775
Brésil	18483	17292	20965	18313
USA	15131	13771	14897	10397
Chine	10769	12391	13884	13930
Mexique	6010	6080	6369	6520
Espagne	5592	5944	6232	6109
Italie	3082	2763	2757	3171
Egypte	2547	2481	2318	2251
Argentine	2651	2465	2450	2660
Turquie	2145	1955	2093	2264
Afrique du sud	1602	1586	1560	1570
Autres	26081	26304	25607	25589

Contrairement au Brésil et aux Etats-Unis, la production du bassin méditerranéen est essentiellement tournée vers les produits frais (81%). En volume produit, l'Espagne se trouve au premier rang, mais cette dominance est fortement concurrencée par les pays du Maghreb. Quant à la France métropolitaine, sa production, bien que très limitée et cantonnée principalement aux seuls citrons et clémentines, bénéficie d'une forte identité régionale : le citron de Menton et la clémentine de Corse. Les petits agrumes sont le fer de lance de l'agrumiculture Méditerranéenne, représentant pas moins de 55% de la production mondiale, ils connaissent un succès croissant plus particulièrement en Europe, le 1^{er} consommateur mondial (sources FAO. Disponible sur : <http://www.unctad.org/infocomm/francais/orange/marche.htm>).

En Méditerranée, le climat et la situation géographique sont propices à la culture de ces variétés à petits calibres. Cependant, cette agrumiculture spécifique est soumise à de fortes contraintes biotiques (*Citrus Tristeza Virus*, *Phytophthoras Sp...*) et abiotiques (salinité, sécheresse, sols calcaires...). La sélection de porte-greffes adaptés est donc cruciale pour sa sauvegarde. Apparues au début du XX^e siècle, les maladies en provenance des Amériques telles que la gommose ou le *Phytophthora sp.*, puis le *Citrus Tristeza Virus* (CTV) ravagèrent les vergers. Afin de lutter contre ces maladies, les premiers porte-greffes résistants au *Phytophthora sp.* furent employés avec succès. Dès lors, des espèces écartées jusqu'alors, car sans valeur agronomique, vont bénéficier d'un regain d'intérêt par leur utilisation en tant que porte-greffe. Les jeux de différentes associations porte-greffes/greffons vont permettre d'améliorer les caractéristiques des variétés cultivées, qu'il s'agisse de la résistance aux contraintes biotiques ou abiotiques, ou encore de modifier les aspects organoleptiques du fruit

pour suivre au mieux les besoins du marché. Le spectre des contraintes diminuant, de nouveaux territoires plus arides furent exploités grâce au développement de l'irrigation intensive (*cf* Figures 3 et 4). Cette expansion peut être suivie par la progression constante de la production agrumicole sur tout le XX^e siècle. Aujourd'hui, la surpopulation, la pollution et principalement le réchauffement climatique, exercent des pressions considérables sur les ressources en eau. L'allongement des périodes de sécheresse, qui accroît les pressions sur les réserves d'eau naturelles, amplifie le phénomène de salinisation des eaux naturelles. De fait, le rationnement des réserves devient une priorité : avec la diminution des réserves, la qualité de l'eau puisée avec excès pour l'irrigation des vergers s'amenuise. Etroitement liés, déficit hydrique et salinité des eaux d'irrigation entraînent des baisses de rendements conséquentes sur les zones de cultures semi-arides.

1.6.3. Les porte-greffes

Les porte-greffes sont essentiellement utilisés en horticulture, arboriculture et viticulture. Ils se distinguent des variétés d'intérêt agronomique par l'utilisation à laquelle ils sont destinés. Si pour les variétés d'intérêts commerciales les critères de sélection se portent particulièrement sur la fructification (qualités organoleptiques du fruit, calibre, rendement, période de fructification, etc.), les variétés de porte-greffes sont surtout sélectionnées pour leurs qualités rustiques (résistance aux maladies, aux ravageurs, au climat, au type de sol, etc.). Le greffage d'une variété d'intérêt agronomique sur un porte-greffe déterminé permet d'améliorer les chances de survie du greffon, mais aussi de modifier certains aspects de ses qualités agronomiques. En agrumiculture, le genre monospécifique *Poncirus* est utilisé comme porte-greffe. De nombreux hybrides entre *Poncirus trifoliata* et différentes espèces du genre *Citrus* ont permis de développer de nouveaux porte-greffes aux caractéristiques très variées. De plus, certaines associations de variétés de porte-greffe / variétés d'intérêt fonctionnent mieux que d'autres en fonction des critères recherchés.

• *Le Bigaradier (Citrus aurantium)*

Le Bigaradier est assez tolérant aux sols salins et alcalins. Il est relativement tolérant au froid, au pourrissement du collet et au *Phytophthora*. Par contre, ce porte-greffe est sensible aux nématodes et au virus de la *tristeza*. Le rendement des pomélos et des oranges greffés sur Bigaradier est modéré, avec une bonne qualité de fruit d'un calibre moyen.

• ***Le mandarinier Cléopâtre (Citrus reticula blanco)***

Sensible au *Phytophthora*, le mandarinier Cléopâtre est tolérant à la *tristeza* et à l'*exocortis*. Moins tolérant aux sols alcalins, il montre cependant de bonnes aptitudes à la sécheresse, aux chlorures et au calcaire. Il est plus tolérant au froid que le Bigaradier. De même que le calibre et la qualité des fruits, le développement et le rendement des greffons sur mandarinier Cléopâtre sont plus faibles que sur Bigaradier. Pour ces différentes raisons, l'utilisation du mandarinier Cléopâtre comme porte-greffe a peu à peu été abandonnée. Aujourd'hui, son utilisation reste marginale.

• ***Le Poncirus trifoliata (Poncirus trifoliata)***

Seule espèce représentant le genre *Poncirus*, le *Poncirus trifoliata* a la particularité d'avoir des feuilles trifoliolées et caduques. Il est très résistant au froid et aux conditions humides. Il ne se développe pas sur sol fortement acide ou alcalin. Très sensible au sel, il absorbe facilement les chlorures qui s'accumulent en quantité dans les feuilles du greffon. Son système racinaire se développant peu en profondeur, le *Poncirus trifoliata* est très sensible à la sécheresse. Très résistant au *Phytophthora*, au pourrissement du collet et aux nématodes, il est également immunisé contre la *tristeza*. Le *Poncirus trifoliata* est considéré comme un bon porte-greffe en association avec les orangers, les pamplemoussiers, les mandariniers et les citronniers (à l'exception du citronnier Eureka), mais ses performances au champ en zone tropicale et sub-tropicales sont faibles.

• ***Le citrumelo Swingle (Citrus paradisi x Poncirus trifoliata)***

Le citrumelo Swingle est un hybride trifoliolé qui égale, voire surpasse, le Bigaradier en ce qui concerne de nombreuses caractéristiques. Il est résistant aux nématodes et au *Phytophthora*, tolérant à la *tristeza* et au pourrissement du collet, bien que ses performances soient moindres que celles du *Poncirus trifoliata*. Cependant, il est vulnérable à l'*exocortis*. Il est sensible aux chlorures malgré le fait qu'il soit le plus tolérant des génotypes trifoliolés. Les sols argileux, calcaires et à pH élevé lui sont peu favorables. Modérément tolérant à la sécheresse et sensible à l'excès d'eau, il est cependant très tolérant au froid. Ses greffons sont vigoureux et produisent des fruits d'un bon calibre avec un excellent rendement. Ce porte-greffe est très utilisé en Australie.

• **Le citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*)**

Le citrange Carrizo, comme le citrumelo Swingle, est un hybride trifoliolé dont les performances de vigueur, de calibre de fruit et de rendement sur le greffon sont intermédiaires entre le Bigaradier et le citrumelo Swingle. Il est tolérant à la *tristeza*, mais il est sensible à l'*exocortis* et aux nématodes. Légèrement résistant au froid et vulnérable aux sols alcalins, il a une résistance supérieure au *Poncirus trifoliata* sur sols calcaires. Cette variété de porte-greffe est aussi sensible aux chlorures et à la sécheresse. Le citrange Carrizo est communément employé en Espagne (région de Valence) et en Corse.

• **La lime Rangpur (*Citrus limonia* Osbeck)**

La lime Rangpur, bien que tolérante à la *tristeza*, est sensible au pourrissement du collet, au *Phytophthora* et à l'*exocortis*. Considérée comme tolérante aux chlorures et à la sécheresse, elle est sensible aux excès d'eau. Le calibre des fruits produits par les greffons sur lime Rangpur est moyen et leur qualité est bonne. La lime Rangpur confère de plus une excellente vigueur et une robustesse au froid. La lime Rangpur est encore beaucoup utilisée en Amérique du sud, particulièrement en Argentine et au Brésil.

1.3.4. La création variétale

Les agrumes étant sexuellement compatibles, de nombreux croisements entre les différentes espèces des 3 genres, *Poncirus*, *Citrus* et *Fortunella*, ont permis de générer de multiples hybrides aux caractères bien distincts de leurs parents. Ceci est vrai aussi bien pour l'obtention de nouvelles variétés d'intérêts commerciales que pour la création de nouveaux porte-greffes. Seuls dépendront les critères de sélection des géniteurs, tels que la qualité organoleptique du fruit pour les variétés d'intérêts commerciales ou les prédispositions de tolérance aux stress biotiques et abiotiques pour les porte-greffes. Par exemple, le citrumélo Swingle porte le nom de Walter S. Swingle qui, par hybridation sexuée entre *Citrus paradisi* et *Poncirus trifoliata*, créa en 1907 cet hybride qui est utilisé de nos jours comme porte-greffe. L'existence de germoplasmes, réalisés à partir de collections d'agrumes existantes comme celle de Corse, permet aujourd'hui de faciliter la sélection sur critères des géniteurs. En effet, d'intéressants caractères de tolérance vis-à-vis de stress biotiques et abiotiques existent dans les espèces du genre *Citrus* et des genres apparentés. La recombinaison génétique, utilisable pour exploiter cette diversité génétique, est limitée par la biologie de la reproduction des agrumes et la forte hétérozygotie de la plupart des cultivars et porte-greffes.

Avec l'essor des biotechnologies, il est aujourd'hui possible de créer des hybrides par hybridation somatique via la fusion de protoplastes (Ollitrault *et al.*, 1996). Cette technique permet d'additionner l'ensemble des génomes nucléaires de 2 cellules mères diploïdes issues de 2 génotypes sélectionnées sur critères d'intérêt. Ainsi, le matériel génétique de la cellule fille est doublé par rapport à ses cellules mères. Le produit de la fusion protoplasmique est donc allotétraploïde. Le Citrus Research and Education Center de l'Université de Floride a entrepris de produire de nombreux hybrides interspécifiques et intergénériques allotétraploïdes à partir de cette technique. Les essais au champ de ces hybrides sont en cours de réalisation (Grosser *et al.*, 2000). Ciblant les problèmes rencontrés par l'agrumiculture en Méditerranée, le CIRAD a lui aussi entrepris la création de nouveaux porte-greffes à partir d'hybridation somatique (Ollitrault *et al.*, 2000). L'une de ses créations, le FLHORAG1, est un hybride allotétraploïde issu de l'hybridation somatique entre *Poncirus trifoliata* cv. Pomeroy et *Citrus deliciosa* Ten. cv. Willow leaf. Il combine à la fois l'immunité à la *tristeza* du *Poncirus* et l'aptitude à se développer sur sol calcaire du mandarinier commun. Des études préliminaires réalisées par Mademba-Sy (2004) et par Saleh (2005) ont montré sa bonne tolérance au stress salin. La robustesse avérée du FLHORAG1 testé en franc-de-pieds lors de ces premières études est encourageante pour l'avenir, néanmoins, il reste à démontrer sa réelle efficacité lors d'une association avec une variété d'intérêt commerciale.

1.7. LA POLYPLOIDIE

1.7.1. Qu'est ce qu'un plant polyploïde ?

Un individu polyploïde est un individu dont le nombre de chromosomes est supérieur à $2n$ copies. Le nombre de copies peut être pair (événement naturel de non ségrégation des chromosomes lors de la mitose ou de la méiose) ou impair (confection de triploïdes aspermes à partir de fusion de protoplastes en laboratoire). Chez les angiospermes, le phénomène de polyploïdisation est un événement naturel responsable de l'ordre de 2 à 4% dans la génération de nouvelles espèces (Otto et Whitton, 2000).

Chez les agrumes, le nombre chromosomique est de $n=9$ (Krug, 1943). Ils sont généralement diploïdes ($2n=2x=18$), mais il existe quelques exceptions. Par exemple, le kumquat Hong Kong est tétraploïde et la Lime Tahiti est triploïde (Longley, 1925). Dans la nature, les plants triploïdes sont issus de l'hybridation de deux plants diploïdes, dont l'un des deux gamètes a connu un incident de division méiotique ayant empêché la séparation de son matériel génétique. Pour les plants tétraploïdes, il est nécessaire de distinguer les allotétraploïdes, issus de l'hybridation de deux gamètes diploïdes n'ayant pas réalisé de réduction méiotique, et les autotétraploïdes, issu de la duplication somatique de leur matériel génétique dû à une non réduction équationnelle lors de la mitose.

• *Un autopolyploïde ?*

Chez un diploïde, le génome est composé d'un ensemble de paire de chromosomes homologues. Chacun de ces chromosomes renferment une copie de l'information génétique. Chez un diploïde, l'information génétique est donc présente en double copie, $2n=2X=18$ chromosomes, *i.e.* AA. Un autotétraploïde, quant à lui, possède 4 copies du même génome, $2n=4X=36$ chromosomes, *i.e.* AAAA (Dalmir Singh Meena, 2006).

Les graines d'agrumes contiennent plusieurs embryons : c'est la polyembryonie. L'un de ces embryons est issu d'une fécondation, l'embryon zygotique, et les autres sont issus d'un mode de reproduction asexué appelé apomixie, les embryons nucellaires. (Cai *et al.*, 1997 ; Sanchez-Damas *et al.*, 2006 ; Shinde *et al.*, 2007). Par conséquent, le matériel génétique du zygote est le résultat de l'hybridation des génomes mâles et femelles, alors que les nucellaires, provenant des tissus maternels, possèdent un génome identique au plant mère. Par une modification de la méiose, l'apomixie permet ainsi une multiplication asexuée générant des plants diploïdes ($2X$) génétiquement identiques (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).

Cependant, des conditions environnementales, principalement de faibles températures (Saleh *et al.*, 2008), semblent être à l'origine d'accidents de division méiotique au cours de l'apomixie. Les cellules ne sont pas réduites et les cellules filles ainsi produites contiennent le même matériel génétique que le plant mère, mais en double exemplaire : ce sont des autotétraploïdes (4X) (Barrett et Hutchison, 1978).

En laboratoire, il est possible d'obtenir artificiellement des polyploïdes par traitement des cellules à la colchicine (Srivastava et Srivastava, 2002). La colchicine inhibe la formation des microtubules et interdit la migration des chromosomes aux pôles lors de la mitose. La cytodiérèse n'a pas lieu alors que le matériel génétique de la cellule a été dupliqué. Une cellule 4X est ainsi obtenue à partir d'une cellule 2X.

• *Un allopolyploïde ?*

Contrairement aux autotétraploïdes, les allotétraploïdes sont issus d'une hybridation interspécifique. Leurs génomes sont différents, car ils proviennent de deux parents d'espèces différentes. Les allotétraploïdes présentent un doublement total du matériel chromosomique après avoir hérité de la totalité du matériel chromosomique de leurs deux parents.

Chez un allopolyploïde, plusieurs génomes peuvent être impliqués, chacun des génomes pouvant avoir différents lots chromosomiques. Par exemple, en prenant compte que chacun des génomes A, B et D possèdent un ensemble de 7 chromosomes, le blé dur tétraploïde détient $2n=4X=AABB=28$ chromosomes et le blé tendre hexaploïde renferme $2n=6X=AABBDD=42$ chromosomes (Dalmir Singh Meena, 2006). Lorsque l'alloploïdie est naturelle, elle peut être le résultat d'un doublement du lot chromosomique après un croisement interspécifique (*cf* Figure 12a), d'une fécondation entre un oosphère et un anthérozoïde non réduits (*cf* Figure 12b) ou d'un croisement entre deux autotétraploïdes (*cf* Figure 12c) (Chen, 2007). En laboratoire, les allotétraploïdes peuvent être obtenus par hybridation somatique grâce à la technique de fusion protoplasmique.

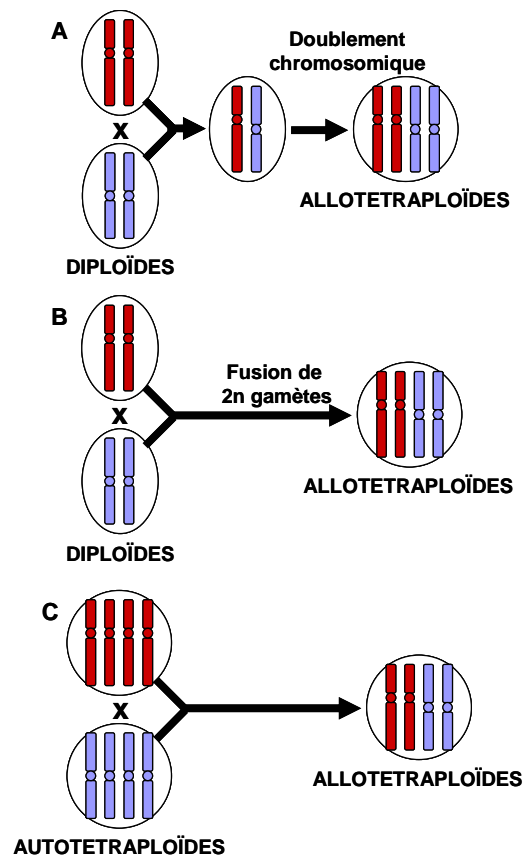


Figure 12 : L'allopolyploïdie naturelle (Chen, 2007).

1.7.2. Morphologie d'un plant tétraploïde

La polyploïdisation s'accompagne d'un accroissement du volume cellulaire (Cavalier-Smith, 1978). Ceci donne un aspect massif aux organes polyploïdes lorsqu'ils sont comparés à ceux des diploïdes (Otto et Whitton, 2000 ; Stupar *et al.*, 2007). Cela peut s'observer en examinant l'épaisseur foliaire entre autotétraploïdes et diploïdes (Cameron et Frost, 1968). Les feuilles polyploïdes présentent également de nombreuses singularités qui les différencient des feuilles diploïdes : elles sont plus épaisses et présentent également une activité photosynthétique et un taux de chlorophylles plus importants (Cameron et Frost, 1968 ; Warner et Edwards, 1993 ; Dabrowska, 1996 ; Zhang *et al.*, 2005), mais elles présentent également des stomates plus grands et une densité stomatique plus faible que chez les feuilles diploïdes (Beck *et al.*, 2003). Les plants tétraploïdes montrent généralement un retard de croissance qui les rend plus petits que les plants diploïdes (Srivastava et Srivastava, 2002). La production fruitière est, par conséquent, plus faible chez un polyploïde. D'un calibre supérieur aux diploïdes, les fruits polyploïdes sont moins juteux et dotés d'une écorce plus épaisse. Ils

comportent également moins de pépins qui sont, néanmoins, plus gros que ceux des diploïdes (Srivastava et Srivastava, 2002 ; Ollitrault *et al.*, 2008).

Chez les agrumes, la fréquence de génération des individus autotétraploïdes parmi les semis de graines polyembryonnées varie de 1 à 3%. Cette fréquence augmente vers les 40° parallèles nord et sud, suggérant qu'elle est étroitement liée aux facteurs environnementaux comme la température (Barrett et Hutchinson, 1978 ; Hutchinson et Barrett, 1982). Si la production de plants triploïdes (3n) permet d'obtenir des variétés aspermes, et donc à fruits sans pépins, les plants tétraploïdes (4n) sont, quant à eux, reconnus pour leur résistance aux contraintes biotiques et abiotiques, qualités recherchées pour la sélection de nouveaux porte-greffes (Barrett, 1992 ; Syvertsen *et al.*, 2000 ; Saleh *et al.*, 2008).

1.7.3. Régulation épigénétique

Par régulation épigénétique est désigné toute modification transmissible et réversible de l'état d'expression d'un gène donné qui n'est induit par aucun changement de la séquence nucléotidique de l'ADN. De fait, la régulation épigénétique englobe les processus de modifications chimiques (méthylation/déthylation) et de changements de la conformation spatiale de l'ADN (méthylation/acétylation de protéines associées comme les histones) qui permettent le contrôle de l'expression de gènes spécifiques (Grant-Downton et Dickinson, 2005).

Les modifications chimiques de l'ADN s'effectuent par la méthylation de résidus cytosine de l'ADN en 5-méthylcytosine. Le nombre et la position des cytosines méthylées influent sur l'expression du gène qu'elles codent. Un haut niveau de méthylation inactive le gène alors qu'un faible niveau de méthylation permet une forte expression du même gène. Ces transformations chimiques peuvent être hérités des parents, mais aussi générés ou modifiés en fonction de facteurs environnementaux (Martienssen et Colot, 2001 ; Riddle et Richards, 2005 ; Takeda et Paszkowski, 2006).

Les modifications spatiales de l'ADN interviennent par une réorganisation spatiale de la chromatine. Celle-ci s'effectue grâce aux histones, des protéines associées à l'ADN, qui influent sur l'état de la chromatine en fonction des modifications post traductionnelles (méthylation ou acétylation) qu'elles subissent (Riddle et Richards, 2005). L'état de la chromatine peut être dit « ouvert » ou « fermé » selon que l'accès au gène par l'ARN polymérase est libre ou non. A l'état ouvert, la chromatine est appelée euchromatine, et à l'état fermé, elle est appelée hétérochromatine (Houben *et al.*, 2003 ; Pfluger et Wagner,

2007). L'hétérochromatine peut-être constitutive à certaines régions du génome. Il s'agit, plus précisément, des régions centromériques et télomériques où aucune transcription n'a lieu (Lamb *et al.*, 2008).

Ces processus de régulation épigénétiques (méthylation de l'ADN, méthylation ou acétylation des histones...) commandent de nombreux phénomènes modulant l'expression génique, comme la paramutation, le « bookmarking », l'« imprinting » et le « silencing ».

• *La paramutation*

La paramutation est une interaction entre deux allèles d'un même locus : le 1^{er} allèle subit une transformation à caractère héréditaire induite par le 2^e allèle. De fait, les paramutations échappent à la première loi de Mendel. Cela signifie qu'un allèle, à une génération donnée, peut modifier un second allèle qui sera transmis à la descendance. Ceci ne nécessite pas que l'allèle ayant causé ces changements soit lui-même transmis. La paramutation d'un unique allèle d'un gène donné peut ainsi affecter un large spectre de phénotype (Hagemann et Berg, 1977 ; Martienssen, 1996 ; Martienssen et Colot, 2001).

• *Le « bookmarking »*

Le « bookmarking » est un phénomène biologique permettant le transfert du profil d'expression génique issu de la mémoire cellulaire de la cellule mère aux cellules filles durant la mitose (Sarge et Park-Sarge, 2005). Il est indispensable au maintien du phénotype des lignées cellulaires aux organes. Son mécanisme impliquerait la non compaction de l'ADN à de nombreuses régions promotrices au cours de la mitose, et serait donc sous influence des modifications d'histones (Kouskouti et Talianidis, 2005).

• *L'« imprinting »*

L'« imprinting » est un processus indépendant des lois Mendélienne qui favorise l'expression unique de l'un des deux allèles du gène hérité des parents. Ainsi, selon le gène impliqué, l'expression s'effectue exclusivement à partir de l'allèle maternel ou exclusivement à partir de l'allèle paternel (Penterman *et al.*, 2007 ; Huh *et al.*, 2008). Ce phénomène a été décrit chez les mammifères, les insectes et les angiospermes, et implique à la fois la modification des histones et la méthylation de l'ADN pour se mettre en place (Constância *et al.*, 1998 ; Alleman et Doctor, 2000).

• **Le « silencing »**

Le « silencing » est un terme générique regroupant l'ensemble des mécanismes qui rendent un gène muet sans aucune modification génétique, *i.e.* par régulation épigénétique. Ce phénomène peut avoir une origine transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Une origine transcriptionnelle lorsque le silencing résulte de modifications d'histones qui, par modulation spatiale de l'hétérochromatine, bloquent l'accès au gène et empêchent, de fait, la transcription. Une origine post-transcriptionnelle lorsque le silencing résulte de la destruction de l'ARNm du gène. L'élimination de l'ARNm empêche ainsi toute traduction en protéine active du gène rendu silencieux. Les gènes peuvent également être rendus silencieux par méthylation de l'ADN (Meins, 1996 ; Martienssen, 1996, Woo *et al.*, 2008).

De nombreux autres phénomènes épigénétiques sont sous contrôle des effets de la méthylation et de la réorganisation de la chromatine : l'inactivation du chromosome X chez les mammifères (les deux chromosomes X portant une information équivalente, un des deux chromosome X est complètement inactivé chez la femelle) (Koringa *et al.*, 2007 ; Panning et Jaenisch, 1998), l'effet de position (altération d'expression d'un gène ayant subi une translocation d'une région du chromosome à une autre) (Singh *et al.*, 2008), la reprogrammation (durant la gamétogénèse, les profils de méthylation de l'ADN originaire des deux parents sont effacés et ré-établis suivant le sexe de l'individu) (Slotkin *et al.*, 2009), la transvection (interaction entre deux allèles situés sur chacun des deux chromosomes d'une même paire conduisant à l'activation ou à la répression d'un gène) (Matzke *et al.*, 2001 ; Rassoulzadegan *et al.*, 2002), et plusieurs effets de la tératogénèse (déformations du fœtus conduisant aux malformations des nouveaux nés) (Horvath *et al.*, 2002).

La méthylation de l'ADN et le réarrangement de la chromatine sont des événements épigénétiques contrôlant l'expression génique, qui sont à la fois transmissibles à la descendance et doués d'une plasticité adaptative. Au même titre des gènes soumis aux lois Mendéliennes, les processus épigénétiques participent à l'évolution des plantes supérieures, et, de fait, interviennent dans le phénomène de spéciation avec un autre phénomène connu pour être une composante majeure de l'évolution des eucaryotes : la polyploïdie (Yang et Peng, 2005 ; Chen, 2007).

1.7.4. Régulation épigénétique chez les polyploïdes

• *Chez les allopolyploïdes*

Masterson, en 1994, a estimé que 30% à 70% des espèces végétales étaient d'origine polyploïdes. Toutes les espèces cultivées de nos jours sont des espèces polyploïdes dont l'évènement de polyploïdisation est plus ou moins ancien (Udall et Wendel, 2006). Cette diversité rend compte du fait que la polyploïdie, avec l'hybridation, fait partie des événements majeurs de l'évolution chez les angiospermes (Soltis *et al.*, 2004 ; Paterson, 2005). La multiplication du matériel génétique permet d'accroître la plasticité de l'adaptation à un environnement donné. Cette plasticité est aussi le fruit d'une modulation de l'expression génique plus importante par les mécanismes génétiques et épigénétiques chez les polyploïdes (Liu et Wendel, 2002 ; Osborn *et al.*, 2003 ; Levy et Feldman, 2004). En effet, les possibilités de réarrangement chromosomique, lors de l'hybridation, sont multipliées par le nombre de génomes en présence : les modifications génétiques faisant intervenir les mécanismes de translocations et d'inversions chromosomiques sont importantes chez les allotétraploïdes (Soltis et Soltis, 1999 ; Wendel, 2000 ; Lysak *et al.*, 2003). Bien que moins importants que l'hybridation, les effets du doublement chromosomique entraînent de nombreuses modifications d'expressions géniques liées aux phénomènes épigénétiques (Adams, 2004). Récemment, ces modifications épigénétiques ont été mises en cause dans le dérèglement de l'horloge circadienne chez des allopolyploïdes d'*Arabidopsis*. Ce dérèglement a été associé à un déséquilibre dans les voies métaboliques des sucres et de la chlorophylle, lui-même induit par des silencing suite au doublement chromosomique. Ce déséquilibre serait à l'origine de l'accroissement de biomasse et conduirait à la formation d'organes plus massifs, phénomènes observés chez tout allopolyploïde comme les allopolyploïdes d'*Arabidopsis* (Ni *et al.*, 2009). Des gènes appartenant à une grande variété de groupes fonctionnels ont un profil d'expression qui varie considérablement d'un gène à l'autre. Alors que certains de ces changements semblent être stochastiques, d'autres sont reproductibles. De plus, ces changements d'expressions peuvent être spécifiques à un organe. En effet, une des copies du gène peut devenir silencieuse pour un organe donné sans que cela soit le cas pour un autre organe. Cette caractéristique est conservée à la descendance, suggérant une spécialisation indépendante de ces gènes homologues issus de la duplication du génome : c'est la subfonctionnalisation (Adams, 2004). Ainsi, la subfonctionnalisation apparaît comme une valeur ajoutée à la plasticité évolutive des allopolyploïdes, ce qui pourrait expliquer que les gènes dupliqués soient conservés dans les génomes polyploïdes (Otto et Whitton, 2000 ; Kellogg, 2003).

• *Chez les autopolyploïdes*

L'accroissement du matériel génétique chez les polyploïdes, qu'ils soient autopolyploïdes ou allopolyploïdes, génère des instabilités du génome, tel que des déséquilibres chromosomiques, des échecs de réplication ou des bouleversements de régulation génique (Paterson, 2005). Les autopolyploïdes sont caractérisés par le doublement de leur propre génome, il n'y a donc pas d'hybridation comme cela est le cas chez les allotétraploïdes. Par conséquent, les modifications phénotypiques observées chez les autopolyploïdes sont les manifestations directes du doublement chromosomique (Chen, 2007 ; Stupar *et al.*, 2007). Par exemple, l'autopolyploïdisation a affecté respectivement de 15 à 23% et de 9 à 55% des loci du génome de *Paspalum rufum* et de *Paspalum notatum*. Ces loci étaient pour la plupart composés de domaines répétitifs soumis aux effets de la méthylation, qui, après autopolyploïdisation, ont été maintenus à l'état méthylé de façon constitutive (Martelotto *et al.*, 2007). Le niveau de ploïdie a été corrélé à l'augmentation de la taille des cellules et des organes. Une étude microarrays réalisée chez la pomme de terre autotétraploïde a démontré que le changement de ploïdie n'affectait que très légèrement l'expression des gènes (Stupar *et al.*, 2007). Le protéome est également très peu affecté par le changement de ploïdie au niveau des feuilles et de la tige chez *Brassica oleracea* autotétraploïde (Albertin *et al.*, 2005). Si les effets épigénétiques se révèlent être prédominants sur les modifications d'expression génétique observés chez les allopolyploïdes (Liu et Wendel, 2003 ; Xu *et al.*, 2009), ceci ne semble pas être le cas chez les autopolyploïdes. En effet, aucune différence de méthylation de l'ADN, de l'acétylation de l'histone H4 et des profils de réplication chromosomique n'a été observé comme une conséquence du doublement chromosomique chez *Silene latifolia* (Siroky *et al.*, 1999). Cependant, un retard de réplication et une hyperméthylation du chromosome X était décelé chez *Silene latifolia* autotétraploïde, suggérant que l'autotétraploïdisation entraînerait des irrégularités de compensation du dosage chromosomique (Siroky *et al.*, 1999). Ces modifications du dosage allélique pourraient être à l'origine des traits constatés chez les autopolyploïdes et leur permettraient d'avoir de meilleures facilités d'adaptation à de nouvelles conditions environnementales (Chen, 2007). Ainsi, à la fin de la dernière ère glaciaire, les polyploïdes ont conquis les espaces vierges laissés par le retrait des glaciers, alors que les diploïdes étaient restés confinés aux endroits qui n'avaient pas connus de glaciation (Brochmann *et al.*, 2004). De même, une étude de la distribution de 62 populations d'*Allium przewalskianum* sur le plateau Asiatique du Qinghai-Tibetan a révélé que les tétraploïdes avaient une meilleure habilité à coloniser les niches créées par les oscillations climatiques du Quaternaire dans cette région (Cui *et al.*, 2008). Ceci

explique le fait que, aujourd'hui, la plupart des espèces arctiques sont des espèces polyploïdes. Cependant, la production de pollen et la fertilité décroît avec le niveau de ploïdie. Ceci est principalement dû aux difficultés d'alignement du nombre important de chromosomes sur la plaque équatoriale lors de la métaphase durant la méiose. Chez les autotétraploïdes, il y a une amélioration de la fertilité du pollen aux générations suivantes grâce à la baisse de fréquence d'apparition des anomalies lors de la métaphase (Srivastava, 2002).

OBJECTIFS

2. OBJECTIFS

2.1. LE PROJET I.N.C.O. (Specific International Scientific Cooperation Activities) C.I.B.E.W.U. (Citrus Breeding for Efficient Water and Nutrient Use)

Le projet INCO CIBEWU a été développé dans le but de répondre aux enjeux de l'agrumiculture Méditerranéenne d'aujourd'hui et de demain. Il a mobilisé durant 3 ans près de 30 chercheurs répartis dans 6 instituts de 5 pays du bassin Méditerranéen (IVIA (Espagne), INRA (Maroc), INAT (Tunisie), INRAT (Tunisie), Université de Cukurova (Turquie), CIRAD (France)) sous la coordination du Dr P. Ollitrault de l'UPR « Amélioration génétique d'espèces à multiplication végétative » du CIRAD.

2.1.1. Les enjeux de l'agrumiculture Méditerranéenne

Seconde région de production agrumicole derrière le Brésil, le bassin Méditerranéen produit essentiellement des fruits frais pour le marché Européen. Or, le marché du fruit frais est extrêmement exigeant en ce qui concerne la qualité des fruits produits, alors que le bassin méditerranéen est en proie à de fortes contraintes biotiques et abiotiques. Parmi les principales contraintes abiotiques figure le manque d'eau dû à l'épuisement des ressources (changement climatique, avancée du Sahara, surpopulation) et la présence de sols calcaires pouvant entraîner des chloroses ferriques chez des variétés d'agrumes sensibles. Le choix d'un porte-greffe adapté peut permettre de pallier ces contraintes et avoir un impact positif sur la qualité des fruits. En Méditerranée, ce choix fut traditionnellement porté vers l'utilisation du Bigaradier, un porte-greffe tolérant à ces contraintes. Cependant, la dissémination de la *tristeza* dans cette région a fragilisé les vergers où le Bigaradier, sensible, était communément utilisé comme porte-greffe. Il est donc devenu indispensable d'identifier ou de créer de nouveaux porte-greffes résistant à cette nouvelle contrainte biotique, avec des qualités de tolérance abiotique au moins équivalentes à ceux du Bigaradier pour que puisse être maintenu la pérennité des vergers en place. Même si l'ensemble des caractères requis existe au sein des ressources génétiques, il est difficile de combiner tous ces caractères par des stratégies d'amélioration traditionnelle du fait des spécificités biologiques et génétiques des agrumes (forte hétérozygotie et polyembryonie). Par conséquent, il était essentiel d'accroître nos connaissances des déterminants physiologiques, génétiques et moléculaires des caractères de tolérance afin d'optimiser les projets de création variétale.

2.1.2. Les objectifs du projet INCO CIBEWU

Le projet INCO CIBEWU avait pour objectif principal d'optimiser l'exploitation des ressources génétiques pour améliorer la tolérance des porte-greffes vis-à-vis du stress salin, de la chlorose ferrique et des maladies, tout en ayant un impact positif sur la qualité des fruits. L'effort de recherche s'est finalement concentré sur les déterminants de la tolérance aux stress abiotiques, car de nombreux travaux d'envergures internationales étaient déjà engagés sur la résistance à la *Tristeza*. Ce travail fut fragmenté en 6 workpackage (WP).

Suivant le processus d'amélioration des porte-greffes, il s'agissait dans un premier temps de normaliser la gestion de collections de porte-greffes au niveau régional (conformité génétique (WP n°1), évaluation et préservation des ressources génétiques locales (WP n°2)). Ces collections de porte-greffes préservent les ressources génétiques nécessaires à la création variétale qui permet, soit par hybridation sexuée (recombinaison et ségrégation des caractères), soit par hybridation somatique (addition de l'ensemble des gènes des parents), de combiner les caractères d'intérêt parentaux dans un nouveau porte-greffe. Ces combinaisons sont généralement d'ordre intergénériques du type *Citrus* (tolérance aux stress abiotiques) x *Poncirus* (tolérances aux stress biotiques). Dans un second temps, il a été nécessaire de développer des indicateurs et des marqueurs de sélection pour la tolérance aux stress salin et à la chlorose ferrique, afin de faciliter la recherche des déterminants de la tolérance chez les futurs parents (WP n°3 et WP n°4). Enfin, dans un troisième temps, le but était d'améliorer les stratégies de réalisation de ces combinaisons intergénériques, qu'elles soient par voie sexuée, par voie somatique ou par manipulation de la ploïdie (WP n°5) et de mettre en place un réseau d'évaluation agronomique (acquisition et partage des données sur l'utilisation des nouveaux porte-greffes quant à leur adaptation à différents environnements et à leur impact sur la qualité des fruits (WP n°6)).

2.2. LES OBJECTIFS DU WP N°5

Le WP n°5, orienté vers les stratégies d'améliorations variétales s'appuyant sur l'hybridation somatique et la manipulation de la ploïdie, se proposait de créer de nouveaux hybrides somatiques allotétraploïdes. En parallèle, des travaux ont dû être menés afin de mesurer l'impact de la ploïdie sur les caractères de tolérance au stress salin et au déficit hydrique des porte-greffes autotétraploïdes.

2.3. LES OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Ce travail de thèse fait partie intégrante du WP5, lui-même étant partie intégrante du projet INCO CIBEWU. Il s'inscrit dans un ensemble de travaux traitant de l'étude de caractères propres aux polyploïdes parmi lesquels figurent la tolérance aux stress salin et au déficit hydrique. L'idée principale est de savoir si l'utilisation de porte-greffes autotétraploïdes, compte-tenu de leurs caractéristiques, peut améliorer les performances des porte-greffes déjà existants dans les exploitations agrumicoles du bassin Méditerranéen.

En connexion avec des travaux antérieurs (Salhe *et al.*, 2008 ; Mouhaya, 2009), cette étude s'est d'abord focalisée sur l'effet d'un stress salin : quels sont les déterminants physiologiques et moléculaires de la polyploïdie jouant sur la tolérance au stress salin chez différents porte-greffes d'agrumes et leurs greffons? En condition contrôlée, les variétés francs de pieds autotétraploïdes exposées à un stress salin modéré étaient moins affectées que leurs homologues diploïdes (Salhe *et al.*, 2008). Cependant, le stress salin entraîne un abaissement du potentiel hydrique du sol tout en induisant des effets toxiques chez la plante qui absorbe les ions avec les nutriments du sol. Il était important de différencier si la tolérance affichée par les plants autotétraploïdes au stress salin était d'avantage liée à leur tolérance aux ions ou à leur tolérance à un déficit hydrique. Ainsi, lorsque les limitations en eau induites par la présence des sels dans le substrat étaient compensées par un arrosage fréquent, les variétés autotétraploïdes ne semblaient pas être plus tolérantes que les variétés diploïdes au stress salin. Des résultats identiques étaient constatés chez ces mêmes variétés utilisées comme porte-greffe avec le cédratier ou le clémentinier SRA92, suggérant l'importance de la toxicité des ions par rapport au déficit hydrique dans la sensibilité de ces génotypes au stress salin (*cf* Art.2). La tolérance au stress salin observée chez les génotypes autotétraploïdes lors des travaux de Salhe *et al.*, (2008) est-elle également observée lorsque ces mêmes variétés sont utilisées comme porte-greffe? Des cédratiers greffés sur Citrange carrizo autotétraploïdes ont ainsi été étudiés sous l'effet d'un choc salin (forte concentration en NaCl et deux arrosages par semaine), mais n'ont pas montré de meilleure tolérance au stress salin que ceux greffés sur diploïdes. Or, la conductance stomatique mesurée en condition témoin a révélé que celle-ci était réduite de moitié chez les cédratiers greffés sur Citrange carrizo autotétraploïde par rapport aux cédratiers greffés sur Citrange carrizo diploïde. Les différences anatomiques et morphologiques ont été préalablement caractérisées entre la lime Rangpur autotétraploïde et la lime Rangpur diploïde (*cf* Art.3). Ces différences, observées entre la lime Rangpur autotétraploïde et diploïde, sont-elles le fruit de modifications de l'expression génique

survenues suite à l'évènement de polyploïdisation chez la lime Rangpur autotétraploïde? La diminution de la conductance stomatique observée en condition témoin chez le cédratier greffé sur Citrange carrizo autotétraploïde se retrouve-t-elle chez d'autres variétés greffées sur d'autres génotypes autotétraploïdes? Si oui, ce trait constitue-t-il un réel avantage lors d'une période de sécheresse prolongée? Quels sont les déterminants biologiques propres aux porte-greffes autotétraploïdes pouvant générer ce phénomène chez le greffon? Le cédratier greffé sur lime Rangpur autotétraploïde et diploïde a été étudié lors d'un déficit hydrique afin de déterminer qu'elle était la tolérance des porte-greffes autotétraploïdes vis-à-vis des porte-greffes diploïdes et de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu (conductance stomatique, expression génétique) (*cf* Art.4). De même, une étude du transcriptome, associée aux mesures physiologiques, a été effectuée chez l'oranger Valencia delta greffé sur lime Rangpur autotétraploïde et diploïde lors d'un déficit hydrique modéré (ensachage des pots) (*cf* Art.5).

MATERIELS & METHODES

3

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal choisi pour cette étude diffère selon le type d'expérience (stress salin ou déficit hydrique) et le lieu de réalisation (Corse ou Espagne). Tous les individus tétraploïdes présentés dans cette étude sont autotétraploïdes, à l'exception du FLHORAG1 qui est un allotétraploïde issu du croisement du *Poncirus trifoliata* et du mandarinier Willow leaf (*Citrus deliciosa* Ten).

Chaque individu a été préalablement testé par cytométrie en flux (*cf* § 3.3.) pour s'assurer de son niveau de ploïdie. De même, une sélection des individus a été effectuée au moyen de marqueurs nucléaires de type SSR (Froelicher *et al.*, 2008) afin de s'assurer de la conformité du matériel : les plants nucellaires ont été sélectionnés et les individus zygotiques écartés.

Chaque expérience possède son propre protocole expérimental. Deux expériences de stress salin ont été réalisées : une en Corse avec une concentration progressive en sel et un arrosage quotidien sur plants polyploïdes franc-de-pieds et greffés (*cf* Tableau 8), et une en Espagne avec une concentration fixe de 500 mM et une fréquence d'arrosage de deux fois par semaine sur plants greffés avec des porte-greffes polyploïdes (*cf* Tableau 9). Deux expériences de déficit hydrique ont également été réalisées en Espagne sur des variétés greffées avec des porte-greffes polyploïdes dont les pots étaient couverts (*cf* Tableau 10) ou non couverts (*cf* Tableau 11).

Tableau 8 : Modalités et conditions expérimentales de la 1^{ère} expérience de stress salin réalisée en Corse.

EXPERIENCE N° 1			
STRESS SALIN			
GENOTYPES	●Mandarinier Willow Leaf (Citrus deliciosa) diploïde et autotétraploïde		
	●Poncirus trifoliata (Poncirus trifoliata (L.) Raf.) diploïde et autotétraploïde		
	●Citrange Carrizo (Citrus sinensis (L.) Osb. x Poncirus trifoliata (L.) Raf.) diploïde et autotétraploïde		
	●FLHORAG1 (Poncirus trifoliata x Citrus deliciosa) allotétraploïde		
	●Poncirus trifoliata (Poncirus trifoliata (L.) Raf.) diploïde et autotétraploïde greffé avec le Cédrat Etrog (Citrus medica) diploïde ou avec le Clémentinier commun (Citrus clementina) diploïde		
	●Citrange Carrizo (Citrus sinensis (L.) Osb. x Poncirus trifoliata (L.) Raf.) diploïde et autotétraploïde greffé avec le Cédrat Etrog (Citrus medica) diploïde ou avec le Clémentinier commun (Citrus clementina) diploïde		
	●FLHORAG1 (Poncirus trifoliata x Citrus deliciosa) allotétraploïde greffé avec le Cédrat Etrog (Citrus medica) diploïde ou avec le Clémentinier commun (Citrus clementina) diploïde		
AGE DES PLANTS		2 ans	
VOLUME DU POT		2 L	
TYPE D'APPORT NUTRITIF		Solide (osmocot)	
ARROSAGE			
Quantité		500 mL	
Fréquence		Quotidien	
Concentration		050 mM (2 semaines)	
		100 mM (2 semaines)	
		200 mM (2 semaines)	
		400 mM (3 semaines)	
CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES		Serre	T°C 18°C-35°C
			H% 30%-90%
COMPOSITION DU SUBSTRAT		1/3 Tourbe – 1/3 Sable – 1/3 Compost	
SAISON - LIEU		Printemps/Eté - Corse	
MESURES			
Fluorescence chlorophyllienne maximale		Hansapen	
		Hebdomadaire	

Tableau 9 : Modalités et conditions expérimentales de la 2^e expérience de stress salin réalisée en Espagne.

EXPERIENCE N° 2			
STRESS SALIN			
GENOTYPES	●Carrizo citrange (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.) diploïde et tétraploïde greffé avec Cédrat Etrog (<i>Citrus medica</i>) diploïde		
AGE DES PLANTS	3 ans		
VOLUME DU POT	3 L		
TYPE D'APPORT NUTRITIF	Liquide		
ARROSAGE			
Quantité	500 mL (2 semaines)		
Fréquence	Tous les 4 jours, 1 ^{er} arrosage sans sel		
Concentration	500 mM		
CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	Serre	T°C	18°C-35°C
		H%	30%-90%
COMPOSITION DU SUBSTRAT	1/3 Tourbe – 1/3 Sable – 1/3 Fibre de coco		
TAILLE DES PLANTS	Carrizo citrange (diploïde et tétraploïde) greffé avec Cédrat Etrog (diploïde) : 75,81 Cm (+/- 3,62 Cm)		
NOMBRE DE FEUILLES / PLANT	Lime Rangpur (diploïde et tétraploïde) greffé avec Cédrat Etrog (diploïde) : 32,04 Feuilles (+/- 1,65 Feuilles)		
SAISON - LIEU	Eté – Espagne (Valence)		
MESURES DE PHYSIOLOGIE			
Fluorescence chlorophyllienne	Fluorpen		
Taux de Chlorophylle	SPAD Minolta		
Conductance stomatique	Poromètre Décagon INC		
Humidité relative du substrat	Sonde Humidité Relative et pesée des pots		
Fréquence des Mesures	Quotidien		

Tableau 10 : Modalités et conditions expérimentales de la 1^{ère} expérience de déficit hydrique réalisée en Espagne.

EXPERIENCE N° 3			
DEFICIT HYDRIQUE			
GENOTYPES	●Lime Rangpur (Citrus limonia, Osbeck) diploïde et tétraploïde greffé avec Cédrat Etrog (Citrus medica) diploïde		
AGE DES PLANTS	3 ans		
VOLUME DU POT	3 L		
TYPE D'APPORT NUTRITIF	Liquide		
ARROSAGE			
Quantité	500 mL (1 semaines) 0 mL (3 semaines)		
Fréquence	Quotidien		
CONDITIONS	Serre	T°C	18°C-35°C
ENVIRONNEMENTALES		H%	30%-90%
COMPOSITION DU SUBSTRAT	1/3 Tourbe – 1/3 Sable – 1/3 Fibre de coco		
TAILLE DES PLANTS	Lime Rangpur (diploïde et tétraploïde) greffé avec Cédrat Etrog (diploïde) : 49,52 Cm (+/- 3,27 Cm)		
NOMBRE DE FEUILLES / PLANT	Lime Rangpur (diploïde et tétraploïde) greffé avec Cédrat Etrog (diploïde) : 28,6 Feuilles (+/- 2,43 Feuilles)		
SAISON - LIEU	Printemps – Espagne (Valence)		
MESURES DE PHYSIOLOGIE			
Fluorescence chlorophyllienne	Fluorpen		
Conductance stomatique	Poromètre Décagon INC		
Humidité relative du substrat	Sonde Humidité Relative et pesée des pots		
Fréquence des Mesures	Quotidien		

Tableau 11 : Modalités et conditions expérimentales de la 2^e expérience de déficit hydrique réalisée en Espagne.

EXPERIENCE N° 4			
DEFICIT HYDRIQUE			
GENOTYPES	●Lime Rangpur (Citrus limonia, Osbeck) diploïde et tétraploïde greffé avec l'Oranger Valencia Delta (Citrus sinensis) diploïde		
AGE DES PLANTS	2 ans		
VOLUME DU POT	3 L, couverture des pots par des sacs plastiques		
TYPE D'APPORT NUTRITIF	Liquide		
ARROSAGE			
Quantité	500 mL (1 semaines) 0 mL (4 semaines)		
Fréquence	1 fois tous les 2 jours		
CONDITIONS	Serre	T°C	18°C-35°C
ENVIRONNEMENTALES		H%	30%-90%
COMPOSITION DU SUBSTRAT	1/3 Tourbe – 1/3 Sable – 1/3 Fibre de coco		
TAILLE DES PLANTS	Lime Rangpur (diploïde et tétraploïde) greffé avec Valencia Delta (diploïde) : 91,5 Cm (+/- 3,07 Cm)		
NOMBRE DE FEUILLES / PLANT	Lime Rangpur (diploïde et tétraploïde) greffé avec Valencia Delta (diploïde) : 111,87 Feuilles (+/- 5,18 Feuilles)		
SAISON - LIEU	Automne – Espagne (Valence)		
MESURES DE PHYSIOLOGIE			
Fluorescence chlorophyllienne	Fluorpen		
Conductance stomatique	Poromètre Décagon INC		
Humidité relative du substrat	Sonde Humidité Relative et pesée des pots		
Fréquence des Mesures	Quotidien		

3.2. MESURES PHYSIOLOGIQUES

3.2.1. Rendement quantique et rendement quantique maximum du PSII

• *Principe*

L'énergie lumineuse absorbée au niveau des molécules de chlorophylle est utilisée pour accomplir la photosynthèse (photochimie). L'énergie en excès est dissipée par un dégagement de chaleur et par une réémission de lumière dans les infrarouges, la fluorescence chlorophyllienne. La photosynthèse, le dégagement de chaleur et la réémission de fluorescence chlorophyllienne sont interdépendants, car ils ont pour origine la même source d'énergie : la lumière solaire. Ils sont donc en compétition pour la même source d'énergie. Par conséquent, tout accroissement de l'efficacité de l'une des composantes entraînera de facto la baisse de rendement des deux autres. De cette manière, la mesure de la fluorescence chlorophyllienne fait état des variations de l'efficacité photochimique et de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (Maxwell et Johnson, 2000).

• *Rendement quantique du PSII (Φ_{PSII})*

Le rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}) rend compte du rendement photochimique. L'état d'excitabilité du PSII est mesuré au cours de son fonctionnement, *i.e.* à l'état excité par exposition continue des feuilles à la lumière. Ce type de mesure ne permet pas de laisser le temps au PSII de se recharger complètement en électron, l'objectif étant de mesurer l'état de fonctionnement du PSII *in situ* en évaluant le rendement photochimique (Maxwell et Johnson, 2000).

$$\Phi_{PSII} = (F'_m - F_t) / F'_m$$

F'_m : rendement de fluorescence maximal à la lumière

F_t : rendement de fluorescence basal

Ces mesures ont été réalisées sur des feuilles matures à l'aide d'un fluorimètre de marque Qubitsystems, modèle Fluorpen FP 100.

• *Rendement quantique maximal du PSII (F_v/F_m)*

Le rendement quantique maximal du PSII (F_v/F_m) rend compte de l'efficacité quantique d'ouverture des centres du PSII. L'état d'excitabilité maximal du PSII est mesuré

suite à une phase de repos, *i.e.* après avoir placé les feuilles dans l'obscurité durant au moins 30 min. En effet, la phase d'obscurité permet au PSII de se recharger complètement en électron, et d'estimer le rendement quantique maximal lors de l'émission du flash saturant par l'appareil de mesure. Ce type de mesure permet d'avoir une estimation de l'état réel du PSII, car toute diminution du rendement quantique maximal est irréversible et correspond à une dégradation de ses centres accepteurs d'électrons (Maxwell et Johnson, 2000).

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

F_m : rendement de fluorescence maximal

F_0 : rendement de fluorescence minimal

Ces mesures ont été réalisées sur des feuilles matures à l'aide d'un fluorimètre de marque Handsapen.

3.2.2. Taux de chlorophylle

Le taux de chlorophylle a été évalué à l'aide du SPAD-502 Chlorophyll Meter de Minolta sur feuilles matures. Le principe de cette mesure directe est basé sur la transmittance lumineuse de la feuille à deux longueurs d'ondes distinctes.

3.2.3. Conductance stomatique

L'état d'ouverture stomatique a été étudié sur feuilles matures au moyen d'un poromètre (Leaf Porometer Decagon Devices INC). Le principe de la mesure repose principalement sur la différence en vapeur d'eau existante entre la chambre sous stomatique et l'air ambiant. Les flux de vapeurs sont alors mesurés par unité de temps et par unité de surface.

3.2.4. Evaluation de la perte hydrique

L'utilisation d'une sonde humidité (WET sensor type WET-2 (Delta -T devices, Cambridge - England) associée à un détecteur d'humidité HH2 (Delta -T devices, Cambridge - England)) a permis d'étudier l'évolution de l'humidité relative du substrat. Ces résultats ont été corroborés par le suivi de la perte hydrique par pesée des plants.

Le potentiel hydrique foliaire a pu être déterminé sur feuilles matures par l'utilisation d'une chambre à pression.

3.2.5. Mesures anatomiques

- *Surface et densité stomatique*

La surface stomatique des plants diploïdes et tétraploïdes a été mesurée sur un échantillonnage de 24 feuilles par génotype à l'aide d'un microscope optique (Laborlux K) selon le protocole de Morillon et Chrispeels, (2001).

- *Epaisseur foliaire*

L'épaisseur foliaire a été mesurée à l'aide d'un micromètre (Mitutoyo, IP65, Japan) sur 10 feuilles provenant de plants diploïdes et tétraploïdes.

- *Taille des plants*

La taille des plants tétraploïdes et diploïdes de même âge a été mesurée du collet à l'apex de l'axe principal à l'aide d'une règle métrique.

3.3. CYTOMETRIE EN FLUX

Le niveau de ploïdie des plants étudiés a été préalablement déterminé par cytométrie en flux. Pour chaque plant, approximativement 0,5 cm² de feuille a été découpé dans 250 mL de tampon d'extraction nucléique (Partec, Cystain UV Precise P). La solution obtenue a alors été filtrée (diamètre des pores : 30 µm) afin d'éliminer les débris cellulaires. 400 mL de tampon traceur a été ajouté à l'éluât (Partec, Cystain UV Precise Staining Buffer) afin de marquer l'ADN. Après 5 minutes d'incubation, l'échantillon a été analysé par cytomètre en flux PA1 (PARTEC). La quantité d'ADN nucléaire a été évaluée suivant le principe décrit par Seker *et al.*, (2002). Un échantillon connu d'agrumes autotétraploïde a été utilisé comme contrôle de référence.

3.4. DOSAGES IONIQUES

3.4.1. Méthode par minéralisation (Exp.1)

- *Préparation des échantillons*

Les feuilles ont été séchées à l'étuve à 60°C durant une semaine, puis elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur à billes (RETSCH). Les racines ont été lavées, séchées et également broyées grâce à un broyeur à billes. 20 mg de poudre végétale (feuilles ou racines) a

été mis à combustion durant 4 heures à 400°C (feuilles) ou à 700°C (racines). Les cendres ont été solubilisées dans 100 mL d'acide nitrique (HNO_3) à 0,5 N. Une moitié de ces solutions a été utilisée afin d'estimer la concentration en chlorure, tandis que l'autre moitié a été utilisée pour évaluer la concentration en sodium. Chaque mesure a été effectuée à partir d'une feuille avec 2 à 5 réplicats biologiques par condition.

• *Mesure des chlorures*

La différence de potentiel de chaque échantillon préparé a été évaluée à l'aide d'une électrode spécifique aux chlorures (Thermo Orion). La concentration en chlorure a été estimée par report de la différence de potentiel mesurée sur la courbe étalon préalablement établit à partir d'une gamme étalon de NaCl.

• *Mesure des Sodiums*

Le dosage des Sodiums a été réalisé par ICP-MS « Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer » à l'US 49 (CIRAD-PERSYST, Montpellier).

3.4.2. Méthode par chromatographe ionique (Exp.2)

Les feuilles ont été séchées à l'étuve à 60°C durant une semaine, puis broyées. 50 mg de poudre végétale (feuilles) a été re-suspendu dans 10 mL d'acide nitrique 0,1 N + acide acétique glacial 10%. Après agitation, le tout a été laissé à décanter toute une nuit, puis filtré (diamètre des pores : 0,45 μm). Le filtrat a été analysé par un chromatographe ionique (ICS-2000, Dionex) et la concentration en chlorure a été déterminée suivant le protocole décrit par Colmenero-Flores *et al.*, 2007. Chaque mesure a été effectuée à partir d'un ensemble de 3 feuilles sur 6 réplications biologiques par condition.

3.5. DOSAGE DE L'ACIDE ABSCISSIQUE (test ELISA)

3.5.1. Principe

La détermination quantitative de l'ABA par test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) permet, par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-ABA, la détection de cette phytohormone dans une gamme de concentration allant de 0,0064 pmol à 0,16 pmol d'ABA par mL. Le principe de cette mesure est basé sur la compétitivité de liaison des anticorps à l'ABA contenu dans les extraits de plantes : l'ABA marqué par une alkaline

phosphatase de quantité connue est mis en compétition avec l'ABA de l'extrait végétal à déterminer pour la liaison à un pool fini d'anticorps anti-ABA. L'ABA marqué et l'ABA de l'échantillon entre alors en compétition pour s'associer aux sites de liaisons des anticorps. Un lavage permet d'éliminer l'ABA marqué non lié avant d'ajouter le substrat de l'alkaline phosphatase. La réaction de la phosphatase alcaline avec son substrat produit une coloration jaune qui rend compte de l'ABA marqué lié aux anticorps. De fait, la coloration jaune produite est inversement proportionnelle à la quantité d'ABA dans l'échantillon. L'intensité de la couleur émise renseigne sur la quantité relative de l'ABA contenu dans l'échantillon par report sur une courbe étalon.

3.5.2. Méthodologie

● *Préparation des échantillons*

10 feuilles ont été mélangées par individu, avec au moins 6 répétitions biologiques par condition. Les feuilles ont été broyées dans de l'azote liquide, puis lyophilisées. 100 mg de poudre végétale a été suspendu dans 1,5 mL de tampon d'extraction contenant 80% d'éthanol, 100 mg.L⁻¹ d'hydroxytoluène butylé et 0,5 g.L⁻¹ d'acide citrique monohydrate. Les échantillons ainsi préparés sont placés sous agitation toute une nuit à 4°C, puis centrifugés à 1000 g durant 20 minutes. Le surnageant a été récupéré, puis séché sous vide. Les résidus déshydratés ont alors été dissous dans une solution composée de 100 µL de méthanol et de 900 µL de tampon Tris salin (50 mM Tris, 0,1 mM MgCl₂•6H₂O et 0,15 M NaCl à pH 7,8).

● *Test ELISA*

Une poudre lyophilisée d'ABA traceur (Phytodetek® ABA Test Kit) a été diluée dans 1 mL d'eau distillée. Après 5 minutes d'attente, 4 mL de marqueur a été mélangé à l'ABA traceur pour former l'ABA marqué. Parallèlement, une gamme étalon a été préparée extemporanément dans du tampon TBS à partir d'une solution mère d'ABA à une concentration de 0,1 µmol.mL⁻¹ (1/100° = 1000 pmol, 1/1000° = 100 pmol, 1/5000° = 20 pmol, 1/25000° = 4 pmol, 1/125000° = 0,8 pmol, 1/625000° = 0,16 pmol, 1/3125000° = 0,032 pmol, l'optimum de sensibilité se trouvant entre 0,0064 et 0,16 pmol d'ABA.mL⁻¹).

100 µL de solution standard de la gamme étalon, ou 100 µL d'échantillon préalablement préparé, a été mélangé à 100 µL d'ABA marqué dans chaque puit d'une plaque ELISA (Phytodetek® ABA Test Kit). La plaque ELISA a été mise à incubation durant 3 heures à 4°C, puis le contenu des puits fut éliminé. Les puits ont été successivement lavés 3

fois avec 200 μL de solution de lavage (Phytodetek® ABA Test Kit). Le substrat, sous forme comprimé, a été dilué dans 5 mL de tampon substrat (Phytodetek® ABA Test Kit), 1 comprimé permettant de réaliser 16 réactions. 200 μL de solution substrat préparée a alors été ajoutée aux puits de la plaque ELISA, qui a alors été placée à incubation durant 60 minutes à 37°C. Après incubation, 50 μL de réactif Stop (Phytodetek® ABA Test Kit) a été additionné à chaque puit pour arrêter la réaction. Après 5 minutes d'attente, la modification de la densité optique générée par la formation du produit a été suivie par mesure de l'absorbance à la longueur d'onde de 405 nm.

La moyenne des densités optiques des solutions standard ou des échantillons a été calculée selon le protocole fourni par le kit Phytodetek® ABA Test Kit. Les pourcentages de liaison ont été estimés selon l'équation suivante :

$$\% \text{ liaison} = [(D.O. \text{ Standard ou } \mathbf{Echantillon} - D.O. \mathbf{NSB}) / (D.O. \mathbf{Bo} - D.O. \mathbf{NSB})] \times 100$$

Avec :

NSB (Liaison non spécifique) : 100 μL d'ABA à 100 pmol.mL^{-1} + 100 μL de marqueur = 0% de liaison.

Bo : 100 μL de tampon TBS + 100 μL de marqueur = 100% de liaison.

La courbe étalon a été établie grâce à la gamme de solutions standards déterminant le pourcentage de liaison (B/Bo) en fonction de la concentration d'ABA (pmol.mL^{-1}). La concentration d'ABA a alors été estimée par report sur la courbe étalon des pourcentages de liaison calculés.

3.6. EXTRACTION ARN

Les tissus végétaux, feuilles ou racines, ont été broyés dans de l'azote liquide. 3 volumes par échantillon ont été mélangés à une solution composée de 15 mL de tampon d'extraction TCES, 10 mL d'acide phénol saturé en eau à pH 4 et 50 μL de β -mercaptoéthanol. L'ensemble a été placé au bain marie à 50°C durant 5 minutes. Après une centrifugation à 4000 rpm de 10 minutes, le surnageant a été récupéré et mélangé avec 1 volume de phénol chloroforme iso amylique (24/24/1). Après une nouvelle centrifugation à 4000 rpm de 10 minutes, le surnageant a été récupéré et mélangé à une solution composée de 0,25 volumes d'éthanol pur à -20°C, 0,185 volumes d'acétate de potassium à 3 M et 1 volume

de chloroforme iso amylique (24/1). Après 10 minutes de centrifugation à 4000 rpm, le surnageant a été à nouveau lavé avec 1 volume de chloroforme iso amylique, avant d'être re-centrifugé à nouveau à 4000 rpm durant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré pour être mélangé à 0,67 volumes de chlorure de lithium à 6 M, et placé à 0°C toute une nuit afin de précipiter les ARNs.

Après une centrifugation de 20 minutes à 10000 rpm, le surnageant a été éliminé alors que le culot a été lavé à l'éthanol 70%. Le culot d'ARN a ensuite été séché à l'étuve à 65°C durant 5 minutes, puis re-suspendu dans 300 µL d'eau millipore stérile. La quantité et la qualité des ARNs ont été déterminées par NanoDrop (NanoDrop®/ND/-1000) et par électrophorèse sur gel formaldéhyde. Les ARNs extraits ont été traités à la DNase I (Fermentas EN0523), puis purifiés sur colonne (Kit Marligen Biosciences, INC Rapid PCR Purification Systems).

3.7. PUCES A ADN

L'utilisation de puces à ADN, ou « microarrays », permet l'analyse du transcriptome à grande échelle dans le but d'identifier et de quantifier les produits de l'expression des gènes des cellules d'un tissu à un instant et dans un environnement donné. Ceci permet de comparer différents états biologiques par identification et quantification de la surexpression ou de la répression de ces gènes.

3.7.1. Principe

Une puce à ADN, appelé aussi chip ou microarray, est un ensemble de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées sur une surface lisse qui peut être du verre, du silicium ou du plastique. Le principe d'une puce à ADN repose sur la capacité de l'ADN dénaturé à reformer une molécule d'ADN double brin lorsqu'il est en présence de son brin complémentaire : la réaction d'hybridation. Les ARNs totaux extraits à partir de cellules d'un tissu donné sont transformés en ADNc par rétrotranscription en incorporant un marqueur qui permet de lier un colorant : le Cyanine 3 (vert) ou le Cyanine 5 (rouge). Cette transformation en ADNc ne concerne que les ARNm. Pour comparer le transcriptome exprimé entre une condition A et une condition B, il suffit, par exemple, de marquer les ADNc de la condition A en vert et les ADNc de la condition B en rouge. Les ADNc sont alors déposés en condition dénaturante sur la lame de verre qui arbore à sa surface l'ensemble du transcriptome connu

d'une espèce donnée. Les molécules complémentaires d'ADNc monobrans s'hybrident entre brins complémentaires pour reformer une molécule d'ADN à double hélice. Des milliers de fragments, appelés aussi sondes, peuvent se lier sur une même puce à ADN. En fonction de la coloration (vert, jaune et rouge), il est possible de déterminer le niveau d'expression du transcriptome pour chaque gène à une condition donnée en comparaison à une autre condition (ex : vert : répression ; jaune : aucun changement d'expression ; rouge : surexpression). Lorsque les gènes en surexpression et répression sont identifiés grâce aux puces à ADN, leurs niveaux d'expression peuvent être estimés par RT-PCR en temps réel. En effet, il est très difficile de quantifier l'expression d'un gène par microarrays. Les puces à ADN fournissent une information qualitative sur un large spectre, puis, cette information doit ensuite être vérifiée sur une série de gènes candidats par une technique quantitative : la RT-PCR en temps réel.

3.7.2. Méthodologie

Les ARNs totaux utilisés pour cette étude sur l'expression du transcriptome par puces à ADN ont été extraits à partir de feuilles prélevées au dernier jour du déficit hydrique de l'expérience 4 (*cf* Tab.10) et de feuilles de Lime Rangpur autotétraploïde et diploïde en condition témoin. Les puces à ADN utilisées pour cette étude ont été élaborées par le « Spanish Citrus Functional Genomics Project » et contiennent 21081 sondes (Martinez-Godoy *et al.*, 2008).

● *Préparation des échantillons*

Une synthèse d'ADNc (ADNc*), marqué par incorporation de dNTP lié à un aminoalyl dUTP, a été réalisée à partir d'ARN purifié. Pour 15 μL de chaque échantillon d'une concentration de 2 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ a été ajouté 3 μL d'oligo dt de même concentration. Le tout a été mis à incubation durant 10 min à 70°C. La solution réactionnelle de la Reverse Transcriptase (SuperScript II, Kit Invitrogen), à laquelle fut ajouté le dNTP marqué à l'aminolalyl dUTP, a été additionnée aux échantillons ainsi préparés. L'ensemble a été laissé toute une nuit à 42°C afin que la réaction de synthèse puisse s'accomplir. L'hydrolyse de l'ARN restant a été effectuée par incubation à 65°C durant 15 min après l'ajout de 10 μL de NaOH 1M et 10 μL d'EDTA 0,5M. Après incubation, 10 μL de HCl 1M a été rajouté afin de neutraliser le changement de pH induit par le NaOH, permettant ainsi la purification des ADNc* synthétisés (Kit Invitak 10202203).

Les ADN_c* purifiés ont été séchés, puis re-suspendus dans une solution comprenant 9 µL de Na₂CO₃ à 100 mM pH 8,5-9 et 4 µL de fluorochrome. Chaque échantillon a été marqué par un des deux fluorochromes, le Cy3 ou le Cy5, de telle sorte que des paires d'échantillons contrôle/stressé puissent être marqués de façon complémentaire. Ainsi, un échantillon contrôle marqué au Cy3 a été associé à un échantillon stressé marqué au Cy5, et vice et versa. Le fluorochrome se fixe à l'ADN_c* par le dNTP marqué à l'aminallyl dUTP après une incubation de 1 à 3 heures à température ambiante et à l'abri de toute lumière. Une nouvelle purification (Kit Invitex 10202203) de l'ADN_c* marqué aux fluorochromes a été réalisée après neutralisation du pH par l'ajout de 40 µL d'acétate de Na⁺ 100 mM pH 5-5,2. Le taux d'incorporation du fluorochrome à son ADN_c* a été estimé pour chaque échantillon (NanoDrop® /ND/-1000). En fonction du nombre de pmol.µL⁻¹ déterminé, la quantité totale de pmol par échantillon a été évaluée. Il est nécessaire d'obtenir au moins 100 pmol par échantillon.

Chaque échantillon en condition contrôle et marqué avec un fluorochrome donné (ex : Cy3) a été uni à un échantillon en condition stressé et marqué avec le fluorochrome opposé (ex : Cy5) pour une quantité de pmol identique. Les échantillons contrôle/stressé assemblés ont alors été déshydratés et entreposés à -80°C en attendant leur hybridation aux puces à ADN.

• *Préparation des puces à ADN et hybridation*

Les spots d'ADN ont été humidifiés à la vapeur et séchés afin de les stabiliser sur leur support. L'ADN a ensuite été immobilisé par exposition à un rayonnement ultra violet (U.V.Crosslinker, 150 mJoules/cm²). Les puces à ADN ont été mises à tremper dans leur solution de préhybridation (SSC 3x, SDS 0,1%, BSA 0,1mg/mL) 1 heure à 50°C. Après incubation, les puces ont été lavées successivement 5 min dans 2 solutions de lavage SSC (0,1x) et 30 s dans de l'eau ultra pure. Enfin, les puces ont été séchées par centrifugation.

L'ADN_c*Cy3/Cy5 a été re-suspendu dans 60 µL de solution d'hybridation (SSC 3x, SDS 0,1%, ADN sp. Saumon 0,1mg/mL), puis incubé 5 min à 95°C. Une fine plaque de verre, préalablement passée par différents bains (SDS 0,5%, eau ultra pure, éthanol 96%, eau ultra pure) et séchée par centrifugation, a alors été ajustée sur la puce. Les 60 µL de solution d'hybridation associé à l'ADN_c*Cy3/Cy5 ont été injectés par capillarité entre la puce et la fine plaque de verre. L'ensemble, transféré dans une chambre étanche, a été placé dans un bain marie à 50°C toute une nuit.

• *Lavages et imagerie*

Les puces ont été retirées de leurs chambres étanches et directement placées dans un bain de SSC 2x + SDS 0,1% à 42°C afin de détacher la lamelle de verre. Les puces ont alors été transférées dans un nouveau bain de SSC 2x + SDS 0,1% et mises à incubation à 42°C avec rotation. Enfin, après différents bains successifs (2 bains successifs de 5 min au SSC 0,1x + SDS 0,1% à 28°C, puis 5 bains successifs de 1 min au SSC 0,1x à 28°C et un dernier lavage de 30 s à l'eau ultra pure), les puces ont été séchées par centrifugation.

L'image de la puce à ADN ainsi préparée a été révélée au scanner (Perkinelmer, ScanArrays Gx) et traitée (Programme Scan Arrays Express) (cf Figure 13). Les données ont alors été analysées par le programme GenePix Pro 6.0. Les résultats obtenus ont été analysés après traitement statistique par le logiciel R (Forment *et al.*, 2005).

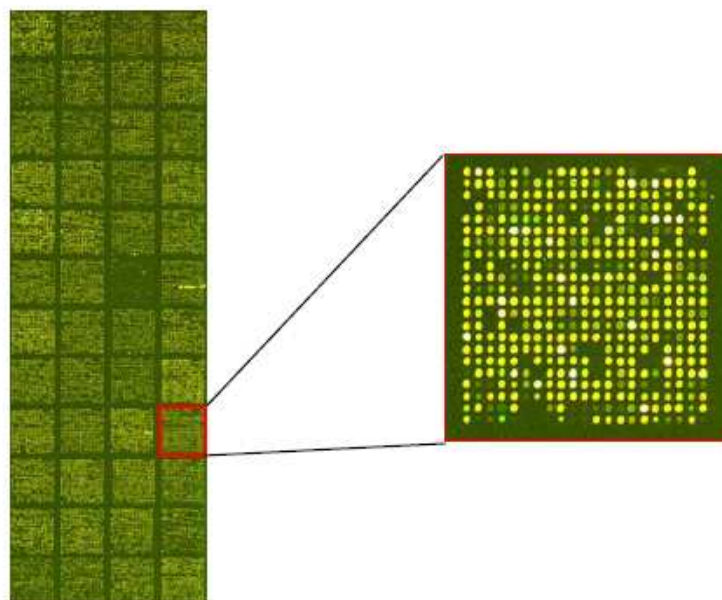


Figure 13 : Résultat d'hybridation sur puce ADNc 20K Citrus

3.8. P.C.R. EN TEMPS REEL

La PCR en temps réel est essentielle pour valider les résultats des analyses par puces à ADN. Que ce soit de façon relative par comparaison d'états biologique, ou que ce soit de façon absolue par numération du nombre de copies du messager, elle permet de mesurer précisément le niveau d'expression d'un gène d'intérêt au sein d'un type cellulaire placé dans différentes situations physiologiques. Ainsi, les résultats des profils d'expression obtenus par puces à ADN sur feuille ont été confirmés par une étude d'expression par RT-PCR en temps réel (une phase de Reverse Transcriptase précédant la PCR en temps réel). Une série de gène,

surexprimée comme réprimée, a été sélectionnée à cet effet. Cette validation de l'analyse par puces à ADN à partir d'échantillons foliaires a été complétée par une étude d'expression par RT-PCR en temps réel réalisée à partir d'échantillons de racines.

3.8.1. Principe

La PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent, dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction PCR. Les données quantitatives sont recueillies pour chaque échantillon lors de la phase exponentielle de la PCR. Ainsi, la PCR en temps réel enregistre l'émission de fluorescence d'un indicateur de la production d'amplicons à chaque cycle de la PCR, et, la première augmentation significative de la quantité d'amplicons détectée se trouve alors en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible. Cette augmentation est significative quand l'émission de fluorescence est statistiquement et significativement supérieure au bruit de fond. Le cycle PCR pour lequel est enregistré cet événement qui amorce la phase exponentielle d'amplification est appelé « cycle seuil ». Plus le nombre de cycle requis pour atteindre le cycle seuil est faible et plus la quantité de matrice de départ est importante (Gibson *et al.*, 1996). La valeur de cycle seuil obtenu est alors converti en un résultat quantitatif par comparaison avec des valeurs du cycle seuil générées à l'aide de matrices de quantification connues (Bustin, 2000).

Deux types de marquage des amplicons existent : les agents intercalant se liant à l'ADN double brin, comme le SYBR green I, et les sondes fluorescentes. Dans cette étude, le SYBR green I (Morrison *et al.*, 1998) a été préféré à l'utilisation des sondes fluorescentes pour des aspects économiques et de facilités d'utilisation. Il a de plus l'avantage d'être plus sensible que le bromure d'éthidium et de ne pas inhiber la réaction d'amplification de la PCR. Libre en solution, le SYBR green I émet peu de fluorescence, mais celle-ci augmente considérablement lorsqu'il se lie à l'ADN double brin en formation. L'incorporation du SYBR green I dépend de la spécificité de liaison des amorces au brin matrice et est indépendante des mutations éventuelles de l'ADN cible qui influe sur le taux d'incorporation des sondes fluorescentes (Bustin 2000, Mackay *et al.*, 2002). Cependant, comme la liaison du SYBR green I à l'ADN n'est pas seulement spécifique à l'amplification, il peut survenir des faux positifs, et une surestimation de la quantification suite à de mauvais appariements des amorces d'amplification est également possible (Bustin, 2000).

3.8.2. Méthodologie

Les ARNs totaux utilisés pour la réalisation de RT-PCR en temps réel ont été extraits à partir de feuilles et de racines prélevées au dernier jour du déficit hydrique de l'expérience 3 et 4 (*cf* Tableaux 10 et 11) et de feuilles de lime Rangpur autotétraploïde et diploïde en condition témoin.

• *Préparation des échantillons*

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de feuilles et de racines, puis purifiés (Kit Marligen Biosciences, INC Rapid PCR Purification Systems) et quantifiés au NanoDrop (NanoDrop/® /ND/-1000). Afin d'éliminer les traces d'ADN résiduelles, les échantillons ont subi un traitement DNase I (Fermentas EN0523) : dans un volume total de 100 μL , 10 μL de tampon et 2 μL de DNase I à 25 u. ont été ajouté pour 100 μg d'ARN totaux. L'ensemble a été placé à incubation à 37°C de 15 à 20 minutes, puis purifié et quantifié à nouveau. Les ARNs totaux traités à la DNase I ont alors été dilués à une concentration identique pour tous les échantillons de 75 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ à $\pm 15 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

• *Définition des couples d'amorces*

Tous les couples d'amorces ont été définis à partir de la banque EST d'agrumes de l'IVIA. Les gènes cibles sont ceux caractérisés en surexpression et en répression par puces à ADN (*cf* Tableaux 12 et 13). Les couples d'amorces ont été définis à l'aide du logiciel Oligoexplorer (Disponible sur : <http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>) paramétré comme suit : $T_m = 55^\circ\text{C}$; taille des amorces = 19 à 20 pb ; taille du produit d'amplification = 100 à 120 pb ; % de GC entre 45% et 55%.

Tableau 12 : Liste des amorces nucléaires utilisées dans l'étude du transcriptome entre la lime Rangpur diploïde et autotétraploïde (*cf* Art.3) par PCR en temps réel.

Gène	N° Accession	Séquence Sondes (5'-3')
<i>Cdc2K</i>	IC0AAA65AG07	F: GTGGGTCTCCTGATGAAACC R: AGCATGTCGGTCAAAGTGTC
<i>H1F</i>	KN0AAH1DF06	F: ACCCTCCTTACTCTGAGATG R: GGAGACTAGCCTTCTGTTTC
<i>Px63</i>	IC0AAA24AF10	F: AAAAGCCGCTGATGTTGAAG R: CCACTCAGAGCCACCATTTC
<i>lhca2</i>	IC0AAA41DB10	F: TGAGACGCTGAGATGGAAC R: GGATGGAGTGTTGAGGATTC
<i>PC</i>	IC0AAA26DC03	F: TGTTCCTAAGCTCTTTCTCTG R: CACCACTCGGAATCTCATC
<i>CCR</i>	IC0AAA41DF01	F: GAAACTGTGTGCTTACATCG R: ATTCGTCACTCCAGGATTC

Tableau 13 : Liste des amorces nucléaires utilisées dans l'étude de l'expression génique par RT-PCR en temps réel chez le cédratier (cf Table 3, Art.4) et l'oranger greffé sur la lime Rangpur diploïde et autotétraploïde (cf Table 4, Art.3 et Table 1, Art.5).

Gène	N° Accession	Séquence Sondes (5'-3')
<i>DH</i>	C31207C07	F: GCCACCGAGTTTGAGAAAG R: GTGGATCGGTGAAGTTTGTC
<i>P5CS</i>	C34107H03	F: CTAGGAAAGCACCATACGAG R: GAGGCCCTCTACATCACTC
<i>RS</i>	C05076C10	F: TCGACGTTATCCATTGCTG R: CACCATTGCCCTTGAAGTG
<i>GolS</i>	C31402D06	F: CCATGGCCTATTATGTCATC R: CATCAGGCAAGTCAAACAG
<i>TPS</i>	C31403D05	F: AGGGGATGACCGTTCTGATG R: GCCATGCTCGGTTTCTGAC
<i>SOD</i>	C31504C12	F: GGAAGTGTTCCTTTAGCG R: TGCCTATGTTTCCGTAAGTG
<i>DHAR</i>	C31402E11	F: AGCCCAGAAGGGAAAGTACC R: AGGCAAATTCAGGAGGATTG
<i>GST</i>	C07010G07	F: AATCGCGAGCTATCATAAGG R: CTACTTCCAGCCATTGTTCC
<i>AOX</i>	KN0AAP7YK07	F: GCGTAAGTTCCAGCATAGTG R: CCTCCAAGTAGCCAACAAC
<i>ERD4</i>	C01019H06	F: CGCTGCCCTGCTACTGTAC R: CCATGCTAGGGGTTTCCTTC
<i>LEA</i>	C34209G11	F: GCGACGGAGAAGAAAGAGG R: CACCACCCCTTCAATCACC
<i>FAE</i>	C32009D10	F: GGGGCTTGAAGAATACAGG R: AATGCCTCAGCTAAAGAAGG
<i>CCR</i>	C34205C03	F: CCTTGCAAAGACACTATCTG R: GATTGAGGGTTCTGTTGAG
<i>WAX2</i>	C02002B06	F: CTCGATGGAACACAAAAGG R: AGTGGTAATGGGTGAAAAGG
<i>psbW</i>	C31604G05	F: CTGTTGGGTGTTTTTGGTC R: TGGGTTTGGCTTTAGACTTC
<i>psaK</i>	C05072A10	F: CGTTGTGGCTTCATTGGTTC R: CCGTTGCTTTCCTGTTTGC
<i>OEE</i>	C31604E09	F: CTCAGGTTCTTTGTTCAAG R: TGGCTCATCAGAGTTCAAC
<i>CAO</i>	C31601G07	F: TACCTATGGAGGCACTTTG R: CACCCCTAGTTTGTCGTAAC
<i>CA</i>	C01015D11	F: CACCAGCTCCTATCATCAAC R: GCAACAGGTTTCAAGTCTTC
<i>PEPC</i>	C16013C03	F: CCAAGCCTACACTCTGAAG R: TAGGGTTAAGCCTCACAAAG

• *Elaboration des courbes étalons*

Une synthèse d'ADNc a été réalisée par Reverse Transcriptase (SuperScript II, Kit Invitrogen) à partir des ARN totaux traités à la DNase I. 3 µL l'oligo dt à 2 µg.µL⁻¹ a été ajouté pour 20 µg d'ARN total. L'ensemble a été placé à incubation durant 10 minutes à 70°C, puis a été ajouté au mélange réactionnel de la RT (par échantillon : 6 µL de Tampon

5x, 3 μL de DTT à 0,1 M, 0,6 μL de dNTP, 0,5 μL de RNase OUT et 2 μL de SuperScript II RT à 200u. μL^{-1}). L'ensemble a été à nouveau placé à incubation à 42°C durant toute une nuit.

L'ARN résiduel a été hydrolysé par incubation à 65°C durant 15 minutes après l'ajout de 10 μL de NaOH à 1 M associé à 10 μL de EDTA à 0,5 M. Le pH a alors été neutralisé par rajout de 10 μL de HCl à 1 M. Les ADNc ont alors été purifiés (Kit Invitek 10202203) puis quantifiés au NanoDrop (NanoDrop/® /ND/-1000).

Une PCR classique a été réalisée à partir des ADNc préparés et des couples d'amorces définis pour la PCR en temps réel. 2 μL d'ADNc ont été ajoutés au mélange réactionnel de la PCR composé de 5 μL de tampon 10x, de 2 μL de dNTP à 10 mM, de 0,5 μL d'amorce F et R à 50 μM , de 38 μL d'eau milliporée stérile et de 2 μL de Taq polymérase. Le thermocycleur était programmé comme suit : 94°C durant 2 minutes, puis 30 cycles à 94°C durant 30 secondes, 55°C durant 30 secondes également et 72°C durant 1 minute, puis, au final, 10 minutes à 72°C.

La moitié du produit PCR a été récupérée pour effectuer une migration sur gel d'agarose à 2% par électrophorèse afin de vérifier la spécificité et la qualité d'amplification des amorces définies. La seconde moitié du produit PCR a été diluée au 1/1000^e, puis, à partir de cette dilution, une gamme de dilution de 10 en 10 a été réalisée de 10⁻¹ jusqu'à 10⁻⁸. Pour chaque gène étudié, cette gamme de dilution représente une gamme standard utilisée en PCR en temps réel. En effet, une valeur de cycle seuil est obtenue pour chaque dilution, ce qui permet l'élaboration d'une courbe étalon pour chaque gène. La spécificité d'amplification est vérifiée si les courbes de fusion, qui correspondent à des pics de fluorescence proportionnels de l'état d'hybridation du produit PCR atteint au T_m, se superposent pour chaque dilution. Ainsi, les valeurs de cycle seuil recueillies de chaque échantillon ont pu être quantifiées par report sur la courbe étalon du gène étudié.

• *Quantification relative par RT-PCR en temps réel*

Pour chaque gène étudié, une dilution ayant permis d'élaborer la courbe étalon est utilisée en tant que référent avec les échantillons. Chaque quantification est moyennée sur une réplication biologique pour une condition donnée.

A 2,5 μL d'ARN totaux à 75 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ a été ajouté le mélange réactionnel de RT-PCR en temps réel (LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I) composé comme suit par échantillon : 4 μL d'eau, 2 μL de Master 1 (LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I), 0,1 μL de reverse transcriptase MultiScribe (Applied Biosystems), 0,2 μL de RNase OUT (Applied Biosystems), 0,6 μL d'amorces F et R à 5 μM . L'ensemble a été placé

en capillaires (LightCycler capillaries (20 μ L)) adaptés au « LightCycler 2.0 instrument » (Roche, Diagnostics GmbH, Allemagne). Le « LightCycler 2.0 instrument » était programmé comme suit : premièrement, une phase de rétrotranscription à 48°C durant 30 minutes, deuxièmement, une phase de PCR (10 minutes de dénaturation à 95°C, 45x(2 secondes de dénaturation à 95°C, 10 secondes d'hybridation à 55°C (T_m), 15 secondes d'élongation à 72°C) et troisièmement, une phase d'augmentation de température jusqu'à 95°C à 0,1°C.s⁻¹).

3.9. COUPE HISTOLOGIQUE DE TISSUS VEGETAUX

3.9.1. Principe

Une coupe histologique est une coupe fine de tissu organique afin de réaliser une observation microscopique détaillée de l'organisation cellulaire. Elle est réalisée soit par un microtome pour des coupes de 5 à 10 μ m d'épaisseur, soit par un ultramicrotome pour des coupes de 1 à 2 μ m d'épaisseur. Pour se faire, les tissus sont inclus dans des résines époxy ou dans de la paraffine.

3.9.2. Méthodologie

● *Echantillonnage*

Des prélèvements de tissus ont été effectués sur 2 plants autotétraploïdes et 2 plants diploïdes de lime Rangpur âgés de 6 mois. 4 types de tissus ont été prélevés : la tige, la feuille, le pétiole et la radicelle. La tige a été prélevée au 3^e et 4^e entre-nœud en partant de l'apex. Les feuilles ont été prélevées sur le 2^e, 3^e et 4^e nœud avec leur pétiole. Les radicelles ont été prélevées sur les plants à l'extrémité des racines. Les tissus ont ensuite été sectionnés en morceaux sous l'eau pour éviter la pénétration d'air dans les tissus. Les radicelles, les tiges et les pétioles ont été coupés transversalement en plusieurs sections, tandis qu'une section rectangulaire au niveau de la nervure centrale a été réalisée pour les feuilles.

● *Inclusion et coupe transversale*

Successivement, les échantillons ont été placés 1 heure dans des solutions à froid à 30% d'éthanol, 50% d'éthanol, 80% d'éthanol, 90% d'éthanol, 95% d'éthanol, puis 24 heures dans de l'éthanol 100% afin de chasser l'eau des tissus et de la remplacer progressivement par de l'éthanol. De la même façon, l'éthanol est progressivement remplacé par de la résine (LR white, London Resin Company Limited). Les échantillons ont été successivement placés 1

heure dans des solutions à froid à 30% LR white / 70% éthanol, 50% LR white / 50% éthanol, 80% LR white / 20% éthanol, 90% LR white / 10% éthanol, 95% LR white / 5% éthanol, et pour finir, 24 heures ou plus à 100% de LR white. Les solutions ont été maintenues à froid dans un premier temps par soucis de conservation des échantillons, et dans un second temps, pour empêcher la solidification de la résine qui peu survenir à température ambiante. Les échantillons ont été encapsulés un à un dans le sens de la longueur dans des capsules de gélatine remplies de résine LR white 100%. Les capsules ont été placées à l'étuve toute une nuit à 45°C pour que la résine se solidifie. Une fois la résine solidifiée, les capsules de gélatine ont été retirées. Les échantillons pris dans la résine ont alors été coupés en fines tranches de 2 µm à l'aide d'un ultramicrotome, puis déposés sur lame.

• ***Préparation des lames et observations***

Près de 15 coupes histologiques ont été placés par lame, avec 3 lames par condition et tissu. Les coupes de tissu ont été colorées avec 0,05% de bleu de toluidine (CI 52040; Merck, Darmstadt, Germany), puis, une fois séchées, une lamelle a été appliquée avec de la colle. Des observations directes ont été effectuées à l'aide d'un microscope optique (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)) à des grossissements de 10x, 25x et 40x. Les couches cellulaires et la taille des cellules ont été mesurées à l'aide du programme Leica IM (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

RESULTATS & DISCUSSION

4

4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. ARTICLE 1 : LES PORTE-GREFFES AUTOTETRAPLOIDES D'AGRUMES SONT PLUS TOLERANT AU STRESS SALIN QUE LES DIPLOIDES

INTRODUCTION : Les zones de culture agrumicole sont soumises à des contraintes abiotiques croissantes sous l'effet du réchauffement climatique. Il devient nécessaire de développer de nouveaux porte-greffes plus tolérant au stress salin afin de pérenniser l'agrumiculture en région semi-aride. Les agrumes sont capables de reproduction asexuée par apomixie partielle. Alors que la grande majorité des agrumes sont diploïdes, il est fréquent que des embryons tétraploïdes soient spontanément générés dans les tissus nucellaires des semences sous l'effet de facteurs environnementaux. Les plants tétraploïdes sont décrits comme étant plus tolérants au déficit hydrique chez d'autres espèces, comme le prunier ou le bouleau. Les agrumes étant très sensibles au stress salin, les tétraploïdes apparaissent comme une nouvelle alternative dans l'élaboration de nouveaux porte-greffes mieux adaptés aux contraintes salines.

MATERIELS ET METHODES : 20 plants diploïdes et tétraploïdes de *Poncirus trifoliata* (sensible), de Citrange carrizo et de mandarinier Cléopâtre (tolérant) ont été soumis à un stress salin modéré (2x/semaine, 50mM) en chambre de culture durant 47 jours. La croissance et le nombre de feuilles ont été mesurés tous les 10 jours. Au 47^{ème} jour, la concentration foliaire en chlorure et en sodium a respectivement été évaluée par l'utilisation d'une sonde chlorure (minéralisation) et par ICP.

RESULTATS ET DISCUSSION : Contrairement à ce qui a été observé au champ, la croissance des plants tétraploïdes a été plus importante que pour les diploïdes en condition témoin (forte humidité et fortes températures). La croissance des géotypes les plus sensibles (*Poncirus trifoliata* et Citrange carrizo) a été affectée quelque soit leur niveau de ploïdie. Cependant, seul le *Poncirus trifoliata* diploïde a subi une défoliation suite à son exposition au stress salin, suggérant que le *Poncirus trifoliata* tétraploïde est plus tolérant que son homologue diploïde. De même, seuls les géotypes diploïdes *Poncirus trifoliata* et Citrange carrizo ont montré des symptômes de chlorose. Les agrumes étant plus sensibles aux ions chlorures qu'aux ions sodium, de plus faibles concentrations foliaires en chlorure mesurées chez les géotypes tétraploïdes Citrange carrizo et mandarinier Cléopâtre révèlent de meilleures aptitudes de tolérance face à leurs diploïdes respectifs. Ces observations doivent être corrélées aux différences anatomiques existantes entre diploïdes et tétraploïdes (épaisseur foliaires, taille

des stomates, etc.) afin de mieux appréhender les mécanismes d'adaptation mis en jeu (implication de l'ABA) entre diploïdes et tétraploïdes.

ARTICLE N°1

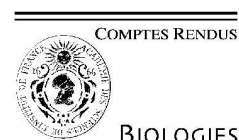
TETRAPLOID CITRUS ROOTSTOCKS ARE MORE TOLERANT TO SALT STRESS THAN DIPLOID

B. Salhe, T. Allario, D. Dambier, P. Ollitrault, R. Morillon

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

C. R. Biologies 331 (2008) 703–710

<http://france.elsevier.com/direct/CRASS3/>

Agronomy / Agronomie

Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid

Basel Saleh¹, Thierry Allario, Dominique Dambier, Patrick Ollitrault, Raphaël Morillon^{*}

Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative, avenue Agropolis - TA A-75 / 02, 34398 Montpellier cedex 5, France

Received 20 April 2008; accepted after revision 20 June 2008

Presented by Philippe Morat

Abstract

Citrus trees are subject to several abiotic constraints such as salinity. Providing new rootstocks more tolerant is thus a requirement. In this article, we investigated salt stress tolerance of three tetraploid rootstock genotypes when compared to their respective diploid rootstocks (*Poncirus trifoliata*, Carrizo citrange, Cleopatra mandarin). Plant growth, leaf fall and ion contents were investigated. At the end of the experiment, leaf fall was observed only for diploid *Poncirus trifoliata* plants as well as chlorosis symptoms for *Poncirus trifoliata* and Carrizo citrange diploid plants. The diploid Cleopatra mandarin plants growth rate was not affected by salt stress and has even been increased for tetraploid Cleopatra mandarin. Ion contents investigation has shown lower accumulations of chloride ions in leaves of the tetraploid plants when compared to diploid plants. Our results suggest that citrus tetraploid rootstocks are more tolerant to salt stress than their corresponding diploid. **To cite this article: B. Saleh et al., C. R. Biologies 331 (2008).**

© 2008 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Les porte-greffe tétraploïdes d'agrumes sont plus tolérants au stress salin que leurs diploïdes respectifs. Les agrumes sont soumis à de nombreuses contraintes abiotiques telles que le stress salin. L'obtention de nouveaux porte-greffe plus tolérants est donc nécessaire. Dans cet article, nous avons comparé le comportement de tolérance au stress salin de trois porte-greffe tétraploïdes avec leurs diploïdes respectifs (*Poncirus trifoliata*, citrange Carrizo, mandarinier Cléopâtre). La croissance des plantes, la chute des feuilles et le contenu en ions ont été étudiés. A la fin de l'expérimentation, une chute de feuilles a été observée uniquement pour les *Poncirus trifoliata* diploïdes, des symptômes de chloroses foliaires n'étant observés que pour les *Poncirus trifoliata* et Carrizo citrange diploïdes. La croissance des plants de mandariniers Cléopâtre diploïdes n'a pas été affectée par le stress et a même été augmentée pour les mandariniers Cléopâtre tétraploïdes. Les dosages ioniques ont montré que les porte-greffe tétraploïdes accumulaient moins des chlorures foliaires que les diploïdes. Nos résultats suggèrent que les porte-greffe d'agrumes tétraploïdes sont plus tolérants au stress salin que leurs diploïdes respectifs. **Pour citer cet article : B. Saleh et al., C. R. Biologies 331 (2008).**

© 2008 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

^{*} Corresponding author at: UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative du CIRAD, Centro de Genómica, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Moncada (Valencia), Spain.

E-mail address: raphael.morillon@cirad.fr (R. Morillon).

¹ Permanent address: Atomic Energy Commission of Syria, Department of Molecular Biology and Biotechnology, P.O. Box 6091, Damascus, Syria.

Keywords: Citrus; Polyploidy; Rootstocks; Salt stress

Mots-clés : Agrume ; Polyploïde ; Porte-greffe ; Stress salin

1. Introduction

Citrus fruit trees present mainly diploid species with a chromosome haploid number of $n = 9$ [1,2], which easily cross among themselves producing fertile hybrids [3]. The great majority is diploid and only some natural polyploids have been identified (Fortunella hindsii and Tahiti lime). Some tetraploids were also found in citrus relatives such as, *Severinia*, *Triphasia*, *Citropsis*, *Aeglopsis*, *Feronia*, *Murraya*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Clausena*, *Microcitrus*, *Eremocitrus*, *Microniolum* [4].

Citrus rootstocks are propagated by polyembryonic seeds. Polyembryony arises from adventitious embryogeny from nucellar cells of the ovule and results in partial apomixis. It was observed that in polyembryonic seeds, the frequency of spontaneous tetraploids varies from 1 to 3% [5]. Tetraploidy seems to be under genetic control and the rate of polyploids obtained can be modified by physiological and environmental factors [5]. Tetraploids are the result of a chromosome stock doubling of the nucellar tissues [6]. In spite of its aptitude to produce a tetraploid seedling with relatively high frequency, tetraploidy seems to have played a negligible part in the evolution of citrus fruits [7]. In citrus fruits, it is worth noting that autetraploid cultivars have a generally poorer yield, a thicker and an irregular fruit bark [8] and then present little interest for human consumption. However, such a phenotype affecting fruit quality is not observed in fruit of allotetraploid scion cultivars [9]. In the field, the use of tetraploid rootstocks is usually associated to a lower growth of the trees. However, the investigation of polyploids as a new source of rootstocks for biotic and abiotic stress tolerance is poorly documented. In ligneous plants such as plum tree and paper birch, it has been shown that tetraploid, and even pentaploid and hexaploid plants, are more tolerant to water deficiency than their corresponding diploid [10,11].

Citrus rootstock tolerance to salt has been investigated for decades. For instance, it has been observed in the field that yield reduction occurs at relatively low salinity levels [12–16]. Burnt leaf symptoms are usually associated with chloride leaf accumulation which causes nutritional imbalances and then senescence and leaf abscission [14,17]. Higher toxicity can also lead to defoliation, twig necrosis and canopy thinning. Salt stress will also decrease the size and the number of fruits that are produced [18]. In short, one can say that the

salinity tolerance range for the mainly used rootstocks is the following: Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) > Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) > Citrus macrophylla (*Citrus macrophylla* Wester) > Sour orange (*Citrus aurantium* [L.] Raf.) > Sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) = Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf × *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) > Citrus Volkameriana (*Citrus volkameriana* Ten) = Rough lemon (*Citrus jamhiri* Lush) > Carrizo citrange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck × *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) > *Poncirus trifoliata* (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) [19]. Rangpur lime and Cleopatra mandarin appear to be chloride excluders [19–21] whereas *Poncirus trifoliata* and its hybrid appear to be sodium excluders [19,22]. It is important to note that citrus trees do not exclude sodium and chloride ions in the mean time [23] and regulatory mechanisms for uptake and transport of chloride and sodium appear to be different [24]. In the citrus industry, the main argument of the use of chloride rootstock excluders is that this criterium is heritable. Most of the time, it confers tolerance to the grafted variety; even so, the effectiveness of the tolerance will also depend of the physiological properties of the variety and the graft itself.

In this work, growth rate, sodium and chloride content of nucellar diploid and tetraploid citrus trees submitted to a salt stress were investigated.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Seedlings were provided by the INRA-CIRAD station of Corsica, France. Three different diploid rootstocks of *Poncirus trifoliata* (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.; SRA 1074), Carrizo citrange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck × *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.); SRA 796), and Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.; SRA 948) have been selected on the basis of their wide range of tolerance towards salinity. Hundreds of seeds of the different genotypes were grown in the greenhouse in pots filled with a mixture of 2/3 perlite with 1/3 vermiculite. Tetraploid rootstocks were identified by flow cytometry among diploid seedlings. The genetic constitution was analysed with 5 simple sequence repeat (SSR) markers (Ci01H05, mCrCIR01E02, mCrCIR07E05, mCrCIR08A03 for *Poncirus trifoliata*; Ci01H05, mCr-

CIR01E02, mCrCIR06A8, mCrCIR07E05, mCrCIR-08A03 for Carrizo citrange; mCrCIR01F04a, mCrCIR-06A8, mCrCIR07E05, mCrCIR08A03, mCrCIR06B05 for Cleopatra mandarin) according to Froelicher et al. [25]. Twenty diploid and tetraploid plants of each genotype were then selected and transferred in a growth chamber. The temperature ranged between 16–18 °C at night and 25–27 °C during the day; relative humidity was maintained at 80% and the light/dark period was 16/8. Plants were irrigated twice a week with half diluted *Hoagland* solution [26]: 0.40 g/L KNO₃; 0.82 g/L Ca (NO₃)₂ 4H₂O; 0.40 g/L MgSO₄ 7H₂O; 0.07 g/L H₃PO₄; 2.86 mg/L H₃BO₃; 2.20 ZnSO₄ 7H₂O; 0.09 mg/L MoO₃; 0.11 mg/L CuSO₄ 4H₂O; 9.15 mg/L MnSO₄ and 67.0 mg/L Fe-Sequestrene. For each genotype, five plants of the same height were selected as control plants and five others were subjected to salt stress. Salt stress was applied by soaking pots twice a week with half diluted *Hoagland* solution complemented with 50 mM of NaCl for 47 days. Control plants were soaked in half diluted *Hoagland* solution.

2.2. Plants sampling and mineral analysis

Plant height and number of leaves were measured and counted every 10 days. The experiment was stopped when symptoms (necroses, burn and leaves fall-down) appeared for *Poncirus trifoliata* that is known to be one of the most salt stress sensitive rootstock. Plants samplings were fractionated into roots, stems and leaves. Those fractions were oven-dried at 60 °C for several days, weighed, crushed in a hammer-mill and stored at room temperature. Mineral analyses were carried out on dried leaves, stems and roots. Samplings were ground and 0.5 g of powder was burnt at 400 °C for 4 hours. The resulting ashes were dissolved in 100 mL of 0.5N concentrated nitric acid. Cations analysis was carried out by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP) at the “Office de l’équipement hydraulique de la Corse”. The sodium content was expressed in mg/g of dry material, and the chloride concentration was determined using a specific chloride electrode (Orion, 9417BN). Chloride content was expressed in mg/g of dry material.

2.3. Statistical analysis

Data analysis (linear regressions, slopes values and r^2) was obtained using Sigma Plot software from SPSS (Chicago; www.spss.com_software_science). Data are expressed by the mean value \pm SD. The t test was used

Table 1

Percentage of tetraploid citrus plants in diploid seedlings from the INRA-CIRAD germplasm of San Giuliano, Corsica

Variety	Accession	Number of seedlings	% of tetraploid
<i>Poncirus trifoliata</i>	SRA 1074	1630	5.4
Carrizo citrange	SRA 796	908	7
Cleopatra mandarin	SRA 948	771	4

to detect differences at the usual probability level of $P = 0.05$.

3. Results

3.1. Tetraploid frequency and genetic homogeneity analysis

Using flow cytometry, tetraploids were screened among plantlets from mother trees of the San Giuliano germplasm. The percentage of tetraploid seedlings from diploid genotypes is presented in Table 1. On polyacrylamide gels, all diploid and tetraploid seedlings presented the same SSRs profile as their parental tree, attesting to their nucellar origin (data not shown). Plants were then grown for 6 months and 10 diploid and tetraploid homogeneous plants were selected for the salt stress experiment.

3.2. Growth rate and leaf number

At the beginning of the experiment, tetraploid plants were significantly smaller when compared to their corresponding diploid (Fig. 1). In the growth chamber, tetraploid control plants of *Poncirus trifoliata*, Carrizo citrange and Cleopatra mandarin presented a faster growth than diploid. Indeed, at the end of the experiment, tetraploid were as tall as the diploid, or were even taller (Fig. 1).

Diploid and tetraploid plants were submitted to a 50 mM salt stress for 47 days. At the end of the experiment, the plant size of diploid and tetraploid *Poncirus trifoliata* grown in control and stress conditions were significantly different. The growth rate of diploid *Poncirus trifoliata* was much more affected by salt stress than for tetraploid *Poncirus trifoliata* since the ratio of the slopes (growth rate in control condition / growth rate in salt stress condition) obtained from linear regressions was greater for diploid (1.87) when compared to tetraploid (1.45) (Fig. 1A, Table 2). At the same time, no statistical difference of the plant height was observed for Carrizo citrange, whatever the ploidy level or the growth condition. Diploid of *Poncirus trifoliata*

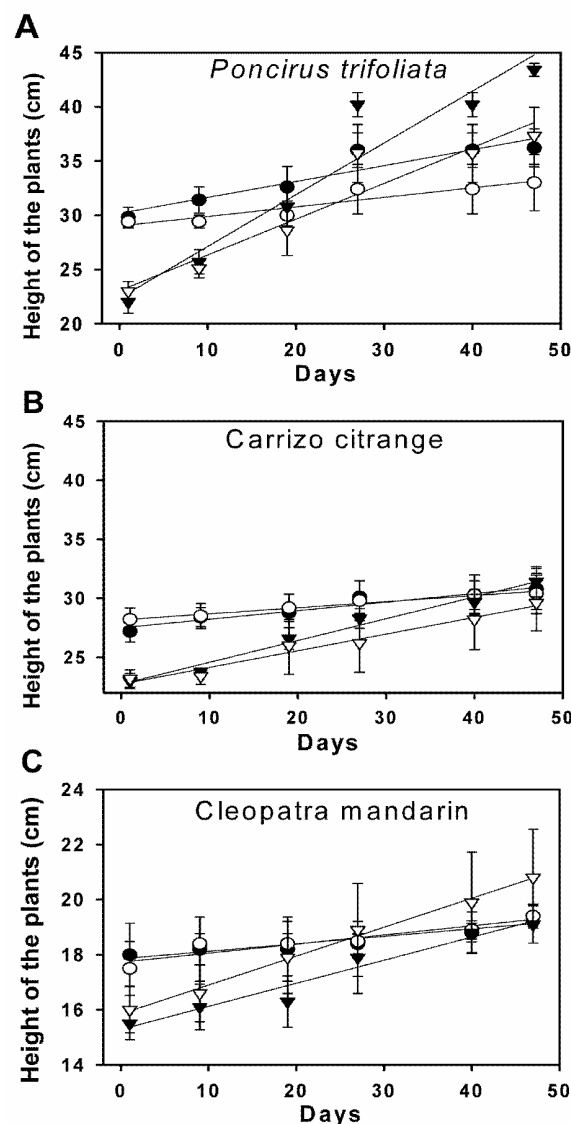


Fig. 1. Growth rate of two salt-sensitive, *Poncirus trifoliata* and Carrizo citrange (A and B, respectively) and salt-tolerant, Cleopatra mandarin (C), diploid and tetraploid rootstocks, grown for 47 days in control and salt stress conditions. (●: diploid / control condition; ○: diploid / stress condition; ▼: tetraploid / control condition; ▽: tetraploid / stress condition). Vertical bars indicate the mean value \pm SD.

and Carrizo citrange plants presented chlorosis symptoms but no symptom was observed for their respective tetraploid genotypes. At the end of the experiment, it is worth noting that only the stressed plants of *Poncirus trifoliata* presented a lower number of leaves when compared to the control plants ($P < 0.05$). This was due to the leaf fall (Fig. 3). Moreover, the greater number of leaves for tetraploid of *Poncirus trifoliata* and Carrizo

citrange when compared to their respective diploid is in agreement with a faster development of those plants (Fig. 3). The same number of leaves for tetraploid plants of *Poncirus trifoliata* in control and stress conditions suggests that the stress decreased the elongation of the stem internodes for this genotype.

The salt stress did not induce any chlorosis symptom in diploid and tetraploid Cleopatra mandarin plants. Also, it did not limit the growth of both genotypes (Fig. 1C). Indeed, after 47 days of stress, tetraploid Cleopatra mandarin plants presented significant statistical differences of height when grown in control and salt stress conditions and the ratio of the slopes (control condition / salt stress condition) obtained from the linear regressions of tetraploid Cleopatra mandarin was less than 1 (Fig. 1C; Table 2). On Fig. 2 is presented a picture of the diploid and tetraploid Cleopatra mandarin plants grown in control and stress condition for 47 days. The right picture shows that the salt stress has promoted the growth of tetraploid Cleopatra mandarin plants. However, the number of leaves of tetraploid plants was smaller when compared to diploid whatever the growth conditions suggesting a faster development of the internodes of the stem in tetraploids (Fig. 3).

3.3. Ion contents

Ion contents were investigated in the root, leaf and stem samplings. Stem ion contents are not presented since no significant change of ion accumulation occurred. Only results for sodium and chloride are presented on Fig. 4 since the other cations did not present significant changes. For *Poncirus trifoliata*, Carrizo citrange and Cleopatra mandarin, sodium content increased similarly in leaves for diploid and tetraploid plants (Fig. 4A). At the root level, only diploid and tetraploid of *Poncirus trifoliata* and tetraploid of Cleopatra mandarin presented a greater sodium accumulation when submitted to salt stress (Fig. 4C).

Concerning the chloride ion distribution in leaves, no significant difference was observed between diploid and tetraploid *Poncirus trifoliata* with quite the same profile of accumulation in roots. For Carrizo citrange and Cleopatra mandarin, the accumulation in leaves was significantly lower ($P < 0.05$) for tetraploid plants when compared to their respective diploids whatever the condition. The roots and leaves chloride profiles of accumulation were quite the same for diploid and tetraploid *Poncirus trifoliata* and Carrizo citrange as well as for diploid Cleopatra mandarin. Finally, a greater accumulation in roots was observed for tetraploid Cleopatra mandarin.

Table 2

Growth rate analysis of diploid and tetraploid genotypes grown in control and salt stress conditions. Slope values were calculated from the linear regression obtained from data of Fig. 1

Variety	Ploidy level	Growth condition	Slope value / r^2	Slope ratio of plants grown in control condition / stress condition
<i>Poncirus trifoliata</i>	2X	Control	0.15/0.88	1.87
		Stress condition	0.08/0.87	
	4X	Control	0.48/0.92	1.45
		Stress condition	0.33/0.91	
Carrizo citrange	2X	Control	0.07/0.92	1.40
		Stress condition	0.05/0.97	
	4X	Control	0.18/0.98	1.29
		Stress condition	0.14/0.97	
Cleopatra mandarin	2X	Control	0.03/0.86	1.00
		Stress condition	0.03/0.85	
	4X	Control	0.08/0.95	0.80
		Stress condition	0.10/0.99	



Fig. 2. Pictures of diploid (left picture) and tetraploid (right picture) Cleopatra mandarin rootstocks grown in control and salt stress conditions for 47 days.

4. Discussion

In order to compare salt stress tolerance of tetraploid rootstocks to their corresponding diploid, we looked for polyploid plantlets among the seedlings. Depending on the genotype, the percentage of tetraploids ranged from 4 to 7 percent, which is quite high (Table 1). If the germination of tetraploids when compared to diploid plants

was not delayed, the growth rate was usually smaller, leading to smaller plants for all the investigated genotypes (Fig. 1). Analysis of the genetic conformity of the plants using SSR molecular markers did not reveal any zygotic plants. Our results suggest that the nonconformity of the citrus rootstocks which may be encountered in the field is mainly due to the presence of tetraploid plants. Plants of the same height of each genotype

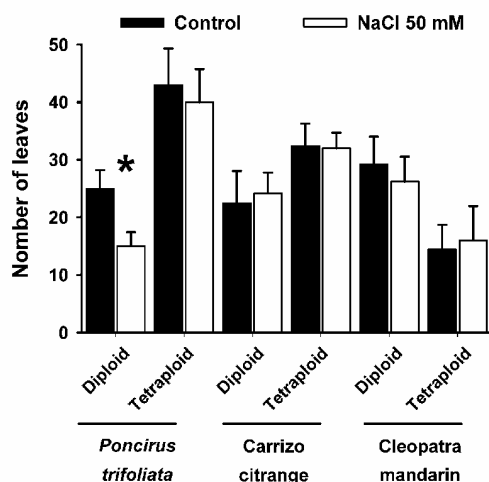


Fig. 3. Number of leaves of diploid and tetraploid plants after 47 days of growth in control and salt stress conditions. Vertical bars indicate the mean value \pm SD, * indicate a statistical significant difference between the number of leaves of control and salt stressed plants for each couple of diploid and tetraploid genotype.

were then investigated for salt stress tolerance. In control growth conditions, tetraploid of *Poncirus trifoliata*, Carrizo citrange and Cleopatra mandarin presented a faster growth than diploid genotypes, suggesting that the high humidity associated to the high temperature and artificial light of the growth chamber promoted the growth of tetraploid plants.

Salt stress for 47 days affected the growth of diploid and tetraploid plants of *Poncirus trifoliata* and Carrizo citrange when compared to control conditions (Fig. 1; Table 2). Contrary to most plant species, salt-induced damage in citrus leaves are not associated to excess of sodium accumulation but to chloride ions [27–30]. Indeed, sodium accumulations were not very different between the diploid and tetraploid genotypes we studied. It is interesting to note that leaf fall was observed at the end of the experiment only for *Poncirus trifoliata* diploid but for tetraploid showing clearly the better tolerance of tetraploid plants (Fig. 3). Also, for *Poncirus trifoliata* and Carrizo citrange, symptoms of chlorosis

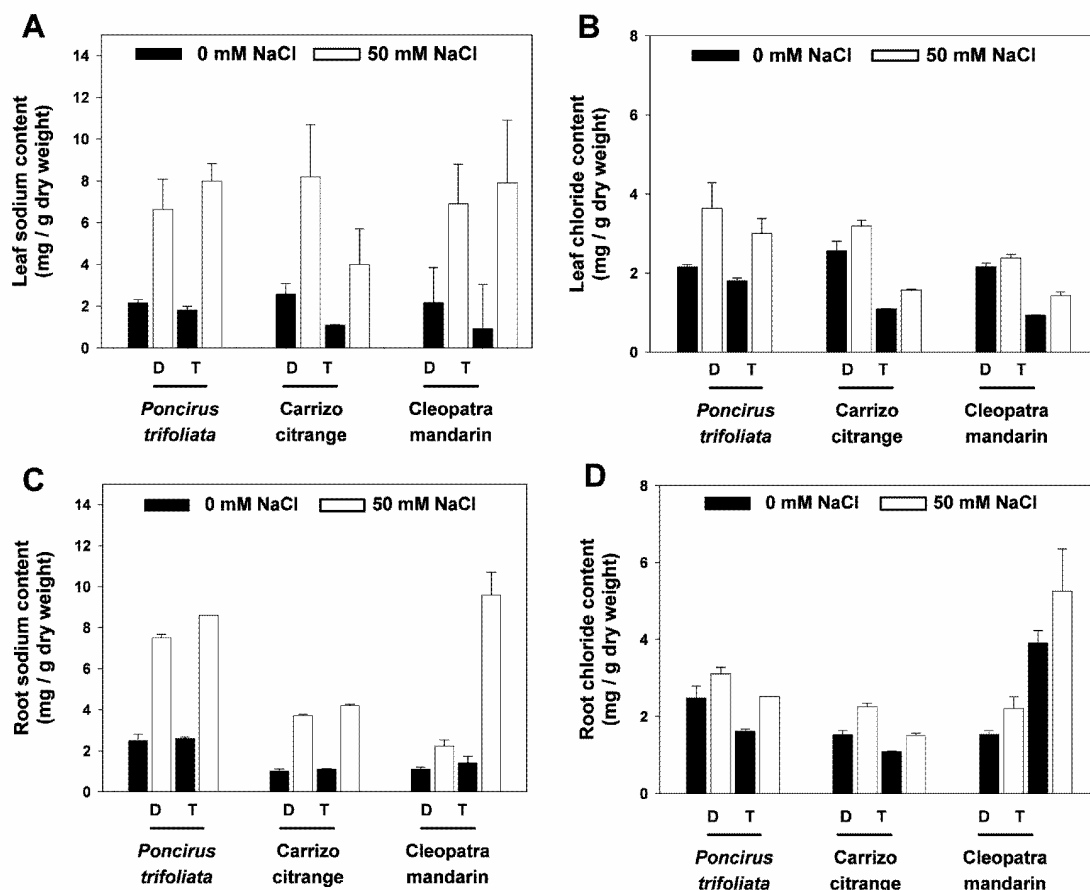


Fig. 4. Sodium and chloride content (mg/g dry weight) of leaves (A and B) and roots (C and D) from diploid and tetraploid plants (D: Diploid; T: Tetraploid) after 47 days of growth in control and salt stress conditions. Vertical bars indicate the mean value \pm SD.

were observed only for diploid plants. The leaf chloride accumulation of *Poncirus trifoliata* tetraploid was not significantly lower than for diploid. However, because of leaf fall, and the use of leaves still attached to the tree for ion content analysis, we cannot exclude that the chloride content was underestimated in diploid *Poncirus trifoliata*. For Cleopatra mandarin, during the whole duration of the experiment, salt stress promoted the growth of the tetraploid plants when compared to control conditions (Figs. 1 and 2, and Table 2). Indeed, for Carrizo citrange and, above all, for Cleopatra mandarin plants, chloride accumulation was significantly lower for tetraploid when compared to diploid. Cleopatra mandarin is one of the most salt tolerant rootstock known to be a chloride excluder [31]. Moya et al. [30] have proposed that chloride ions are translocated in the leaves throughout the transpiration stream. So, we may suppose that the greater growth rate of Cleopatra mandarin tetraploid, when compared to diploids, is in relation to the lower accumulation of this ion in the leaves. Curiously, a greater accumulation of chloride and sodium was observed in root samplings of tetraploid Cleopatra mandarin. Hence, it would be necessary to monitor ionic concentrations at the cellular level in order to check if specific ions compartmenting at the root level is involved and may explain why chloride ions are not translocated to the leaves in tetraploid Cleopatra mandarin plants.

Moreover, since tetraploids have specific behaviour such as thicker leaves, a difference in the number and size of the stomata when compared to their respective diploid plants [11], one may expect that those anatomical traits could lead to better adaptation to abiotic stresses as it has been observed in paper beech [11]. In plume, Pustovoitova et al. [10], observed that tetraploids are more tolerant to water deficiency, and this tolerance is associated to a greater ABA synthesis. From the seed to the plant, if polyploids synthesise more ABA, it could explain the reduced growth we observed in tetraploid when grown in the greenhouse or in the field. Better regulation of the transpiration associated to a better osmotic adjustment in water stress conditions may explain the greater tolerance observed in prune and wheat polyploid [10,32].

Finally, it is required to study the compartment of those tetraploid genotypes when grafted in order to verify if the greater tolerance to water stress is also observed for the association. If this hypothesis is verified, tetraploids could be a new source of rootstocks for the citrus industry.

Acknowledgements

We thank F. Luro and S. Jaffuel for helpful discussions and C. Jacquemond, F. Curk and Jean-Marc Gandoïn (Unité GEQA, INRA, San Giuliano, France) for providing diploid seedlings and technical assistance. François Santoni from Office de l'équipement hydraulique de la Corse (OEHC) is also thanked for ICP assays.

References

- [1] C.A. Krug, Chromosome numbers in the subfamily *Aurantioideae* with special reference to the genus, *Citrus Bot. Gaz.* 48 (1943) 602–611.
- [2] J.W. Cameron, H.B. Frost, Genetic breeding and nucellar embryony, in: W. Reuther, L.D. Batchelor, H.J. Webber (Eds.), *The Citrus Industry*, University of California Press, Berkeley, 1968, pp. 325–370.
- [3] H.C. Barrett, Hybridization of citrus and related genera, *Fruit Varieties J.*, University Park 39 (1985) 11–16.
- [4] M. Iwamasa, N. Nito, J.T. Ling, Intra and intergeneric hybridization in the orange subfamily, *Aurantioideae*, in: Goren, Mendel (Eds.), *Proc. Int. Citric. Cong.*, Balaban Publishers, Philadelphia/Rehovot, 1988, pp. 123–130.
- [5] H.C. Barrett, D.J. Hutchinson, Occurrence of spontaneous octoploidy in apomictic seedlings of a tetraploid *Citrus* hybrid, *Proc. Int. Soc. Citric.* 1 (1982) 29–30.
- [6] J.W. Cameron, R.K. Soost, Characters of new populations of *Citrus* polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny, in: H.D. Chapman (Ed.), *Proc. Int. Citric. Symp.*, vol. 1, University of California at Riverside, 1969, pp. 199–205.
- [7] P. Ollitrault, D. Dambier, F. Luro, Y. Froelicher, Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus, *Plant Breed. Rev.* 30 (2008) 323–352.
- [8] R.K. Soost, J.W. Cameron, *Citrus*, in: J. Janick, J.N. Moore (Eds.), *Adv. in Fruit Breed.*, Purdue University Press, West Lafayette, 1975, pp. 507–540.
- [9] W.W. Guo, D.P. Prasad, F. Serrano, G. Gmitter Jr., J.W. Grosser, Citrus somatic hybridization with potential for direct tetraploid scion cultivar development, *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79 (2004) 400–405.
- [10] T.N. Pustovoitova, G.V. Eremin, E.G. Rassvetaeva, N.E. Zhdanova, V.N. Zholkevich, Drought resistance, recovery capacity, and phytohormone content in polyploid plum leaves, *Russian J. Plant Phys.* 43 (1996) 232–235.
- [11] W.L. Li, G. P. Berlyn, M.S. Ashton, Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *Betula papyrifera* (*Betulaceae*), *Am. J. Bot.* 83 (1996) 15–20.
- [12] R.R. Walker, T.J. Douglas, Effect of salinity level on uptake and distribution of chloride sodium and potassium ions in *Citrus* plants, *Aust. J. Agric. Res.* 34 (1983) 145–153.
- [13] M. Zekri, L.R. Parsons, Growth and hydraulic conductivity of several *Citrus* rootstocks under salt and polyethylene glycol stresses, *Physiol. Plant* 77 (1989) 99–106.
- [14] A. Gomez-Cadenas, F.R. Tadeo, E. Primo-Millo, M. Talon, Involvement of abscisic acid and ethylene in the response of citrus seedlings to salt shock, *Physiol. Plant* 103 (1998) 475–484.

- [15] J. P. Syvertsen, Y. Levy, Salinity interactions with other abiotic and biotic stresses in citrus, *Hort Tech.* 15 (2005) 100–103.
- [16] F. García-Sánchez, J.P. Syvertsen, V. Martínez, J.C. Melgar, Salinity tolerance of Valencia' orange trees grafted on contrasting rootstocks is not improved by moderate shade, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 3697–3706.
- [17] J. Bañuls, M.D. Serna, M. Legaz, E. Primo-Millo, Growth and gas exchange parameters of citrus plants stressed with different salts, *J. Plant Phys.* 150 (1997) 194–199.
- [18] T.J. Flowers, P.F. Troke, A.R. Yeo, The mechanism of salt tolerance in halophytes, *Ann. Rev. Plant Phys.* 28 (1977) 89–121.
- [19] M. Zekri, L.R. Parsons, Salinity tolerance of *citrus* rootstocks: Effect of salt on root and leaf mineral concentrations, *Plant Soil* 147 (1992) 171–181.
- [20] W.C. Cooper, B.S. Gorton, Toxicity and accumulation of chloride salts in *citrus* on various rootstocks, *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 59 (1952) 143–146.
- [21] W.C. Cooper, Toxicity and accumulation of salt in citrus trees on various rootstocks in Texas, *Proc. Fla State Hortic. Soc.* 74 (1961) 95–104.
- [22] A. Elgazzar, A. Wallace, N. Hemaidan, Sodium distribution in rough lemon and trifoliate orange seedlings, *Soil Sci.* 99 (1965) 387–391.
- [23] P.T. Gallasch, G.S. Dalton, Selecting salt tolerant citrus rootstocks, *Aust. J. Agr. Res.* 40 (1989) 137–144.
- [24] G. Fernandez-Ballester, F. Garcia-Sanchez, A. Cerda, V. Maertinez, Tolerance of citrus rootstock seedlings to saline stress based on their ability to regulate ion uptake and transport, *Tree Physiology* 23 (2003) 265–271.
- [25] Y. Froelicher, D. Dambier, G. Costantino, S. Lotfy, C. Didout, V. Beaumont, P. Brottier, A.-M. Risterucci, F. Luro, P. Ollitrault, Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco), *Mol. Ecol. Res.* 8 (2008) 119–122.
- [26] D.I. Arnon, D.R. Hoagland, Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients, *Soil Sci.* 50 (1940) 463–483.
- [27] J. Bañuls, E. Primo-Millo, Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of Citrus plants, *Phys. Plantarum* 86 (1992) 115–123.
- [28] J. Bañuls, E. Primo-Millo, Effect of salinity on some citrus scion-rootstock combinations, *Ann. Bot.* 76 (1995) 97–102.
- [29] R. Romero-Aranda, J.L. Moya, F.R. Tadeo, F. Legaz, E. Primo-Millo, M. Talon, Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations, *Plant, Cell and Env.* 21 (1998) 1243–1253.
- [30] J.L. Moya, A. Gomez-Cadenas, E. Primo-Millo, M. Talon, Chloride tolerance in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water usage, *J. Exp. Bot.* 383 (2003) 825–833.
- [31] A. Cerdá, F.G. Fernandez, M. Caro, M.G. Guillén, Growth and mineral composition of two lemon varieties irrigated with saline water, *Agrochimica* 23 (1979) 387–396.
- [32] B. Teulat, D. Rekika, M.M. Nachit, P. Monneveux, Comparative osmotic adjustments in barley and tetraploid wheats, *Plant Breeding* 116 (1997) 519–523.

4.2. ARTICLE 2 : EN FORTE CONTRAINTE SALINE ET SANS MANQUE D'EAU, LES PLANTULES D'AGRUMES TETRAPLOIDES SONT PLUS SENSIBLES QUE LES DIPLOIDES

INTRODUCTION : Le rendement des vergers d'agrumes des zones semi-arides diminue suite à l'accroissement des teneurs en sels des sols, conséquence indirecte du réchauffement climatique. L'utilisation de plants tétraploïdes pourrait permettre de développer des porte-greffes plus tolérants capables de pallier l'aggravation des contraintes abiotiques. Le *Poncirus trifoliata*, sensible au stress salin, accumule les Cl^- et exclu les Na^+ . A l'inverse, le mandarinier Cléopâtre, tolérant au stress salin, exclue les Cl^- . Un allotétraploïde appelé FLHORAG1 a été généré par hybridation somatique entre le *Poncirus trifoliata* et le mandarinier Cléopâtre. Le FLHORAG1 a été comparé aux *Poncirus trifoliata* et mandarinier Cléopâtre diploïdes et autotétraploïdes au cours d'un stress salin. Les plants tétraploïdes sont présumés plus tolérants au déficit hydrique chez de nombreuses espèces.

MATERIELS ET METHODES : 10 plants diploïdes et autotétraploïdes de *Poncirus trifoliata*, de mandarinier Cléopâtre et 10 plants allotétraploïdes FLHORAG1 ont été soumis à un fort stress salin (1x/jour, 50mM, 100mM, 200mM, 400mM) en serre durant 48 jours. L'arrosage quotidien a permis de maintenir le potentiel hydrique du substrat proche de celui de la concentration saline appliquée. Le rendement quantique maximum du PSII a été mesuré chaque semaine. La concentration foliaire en chlorure et en sodium a respectivement été évaluée par l'utilisation d'une sonde chlorure (minéralisation) et par ICP toutes les 2 semaines. Une étude du transcriptome par RT-PCR en temps réel a également été effectuée à partir de gènes candidats spécifiques au stress salin le 41^{ème} jour.

RESULTATS ET DISCUSSION : Sans limitation en eau, les génotypes tétraploïdes soumis à un fort stress salin n'ont pas montré une meilleure tolérance par rapport aux diploïdes. L'eau, disponible en excès dans le substrat, a probablement permis de maintenir le flux transpiratoire assez longtemps pour entraîner un maximum de sels vers les parties aériennes. Les feuilles tétraploïdes étant plus épaisses, elles ont également une plus grande capacité de stockage. Ceci explique pourquoi les Cl^- , comme les Na^+ , se sont retrouvés en plus fortes quantités dans les feuilles tétraploïdes. Le rendement quantique maximum du PSII mesuré était plus faible chez les tétraploïdes et inversement proportionnel à l'accumulation des ions dans les feuilles. L'étude de l'expression des gènes candidats a révélé peu de différences entre tétraploïdes et diploïdes. Ceci suggère que la tolérance observée chez les tétraploïdes (cf Art.1) pourrait dépendre principalement de la disponibilité en eau dans le substrat.

ARTICLE N°2

IN HIGH SALT STRESS CONDITION WITHOUT WATER SHORTAGE, TETRAPLOID CITRUS SEEDLINGS ARE MORE SENTITIVE THAN DIPLOID

W. Mouhaya, T. Allario, J. Brumos, F. Andrès, M.
Talon, P. Ollitrault, R. Morillon

IN HIGH SALT STRESS CONDITION WITHOUT WATER SHORTAGE, TETRAPLOID CITRUS SEEDLINGS ARE MORE SENSITIVE THAN DIPLOID

Wafa Mouhaya¹, Thierry Allario¹, Javier Brumos², Fernando Andrés², Manuel Talon², Patrick Ollitrault¹ and Raphaël Morillon^{1*}

¹Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

²Centro de Genomica, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

*Author to whom correspondence should be addressed. UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative du CIRAD, Centro de Genomica, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) 46113 - Moncada - Valencia Spain.
Phone: (00 34) 963 424 143 Fax: (00 34) 963 424 106. E-mail: raphael.morillon@cirad.fr

ABSTRACT

In this article, we investigated tolerance to high salinity constraint in diploid (2X) and tetraploid (4X) citrus under no water limitation. Comparisons were made between two different doubled diploid, their respective diploid (trifoliate orange and Willow leaf mandarin) genotypes, and the allotetraploid (FLHORAG1) obtained from the protoplast fusion of trifoliate orange and Willow leaf mandarin. A strong salt stress was applied by increasing progressively the concentration of NaCl from 50 mM to 400 mM for 8 weeks. Two years old plants were watered each day in order to apply a constant water potential. Maximum quantum yield of PSII as well as the leaf and root chloride and sodium content were monitored. We previously reported that under moderate salinity constraint, citrus 4X genotypes were more tolerant than 2X but in the presented experimental conditions, 4X seedlings were certainly more sensitive. Chloride accumulation in 4X leaves was greater than in 2X and maximum quantum yield of PSII was more reduced in 4X. The expression of several candidate genes involved in signal transduction, sodium and chloride transport, osmotic adjustment and regulation of the stomata opening as well as detoxification processes were also investigated by real time RT-PCR. A good correlation was observed between phenotype of sensitivity to stress and gene expression changes. The results suggest that the application of a high salt stress concentration without water limitation do not limit the transport of chloride and sodium to citrus leaves, 4X genotypes accumulating more toxic ions and being more affected by stress than 2X.

KEYWORDS : citrus, polyploidy, rootstocks, salt stress

INTRODUCTION

Citrus industry is confronted to many biotic and abiotic stresses. In order to cope with those stresses and to maintain fruit quality, citrus varieties are grown on rootstocks. To date, most of the rootstocks used belong to the *Citrus* and *Poncirus* genera, or to hybrids obtained between those two genera (Barrett, 1985). In the field, most of the rootstocks are clones from their mother tree because of partial apomixis. Indeed, the percentage of zygotic plants we obtained in seedlings of trifoliate orange and Willow leaf mandarin was minor than 3% (Saleh et al., 2008).

Citrus rootstocks tolerance to salt stress has been investigated for decades. To date, damages caused by salinity in citrus trees were usually associated with chloride accumulation but not with sodium (Bañuls et al., 1997 ; Moya et al., 2003). One strategy that has been developed to improve salt stress tolerance is to use rootstocks that limit the root chloride absorption and by the way limit the leaf chloride accumulation (Cooper et al., 1952 ; Bañuls and Primo-Millo, 1995). On one hand, *Poncirus trifoliata* and its hybrids were shown to be sodium-excluders (Elgazzar et al., 1965 ; Zerki and Parsons, 1992) and are known for their capability to accumulate chloride. On the other hand *Citrus* such as Cleopatra mandarin and Rangpur lime are known to be salt tolerant rootstocks and were shown to be chloride-excluders (Cooper, 1952 ; Zerki and Parsons, 1992). Mechanisms involved in sodium compartmentation out of the cytoplasm are well documented in *Arabidopsis* and citrus and many encoding genes for Na⁺ co-transporters and regulators such as *NHX1*, *SOS1*, *SOS2* and *SOS3* were characterized (Apse et al., 1999 ; Shi et al., 2003 ; Guo et al., 2004). However chloride uptake and associated transporters is still poorly documented. In citrus, Colmenero-Flores et al. (2007) characterized recently a chloride transporter involved in long-distance transport and development process. If chloride absorption is not limited at the root level, those ions will be translocated to the leaves throughout the transpiration stream where they will cause necrosis and even defoliation (Moya et al., 2003).

When a salt stress occurs, other genes are also triggered such as encoding genes for transcription factors involved in signal transduction (zinc finger and Myb proteins) (Sakamoto et al., 2002 ; Dai et al., 2007), and genes involved in the biosynthesis of osmoticum such as choline monooxygenase (*CMO*) and Δ 1-pyrroline-5-carboxylate-synthetase (*P5CS*) (Subbarao et al., 2001 ; Ueda et al., 2004) and chaperon proteins such as Group 5 Late Embryogenesis Abundant Protein (*LEA5*) (Moons et al., 1995 ; Naot et al., 1995). Genes involved in ABA

biosynthesis and then to stomata opening regulation such as *NCED* will also be triggered (Rodrigo et al., 2006). To end, genes coding enzymes involved in detoxification processes such as catalase and glutathione reductase will also be expressed in order to cope with ROS injuries (Davenport et al., 2004 ; Ferreira et al., 2004).

Polyploids may be allopolyploids or autopolyploids and may result either from sexual reproduction via $2n$ gametes or somatic chromosome doubling.

It is usually admitted that to growth vigor and biomass is promoted in allopolyploids, because of gene expression changes resulting from the increase of heterozygosity (Adams et al. 2003). After duplication, subfunctionalization may occur, and gene copies may become specialized to perform complementary functions (Ward & Durrett 2004) and may favor adaptation to environmental changes. On the contrary, it is expected that alteration of the expression of any allele in autopolyploids may result to phenotype changes since no potential for homologous complementation or advantageous subfunctionalization would occur. Investigated of autopolyploid series in potato using microarrays showed that gene expression changes were very limited, suggesting that autopolyploids derive all of their alleles from a single specie and may experience fewer alterations in their regulatory networks, resulting in fewer gene expression changes (Stupar et al. 2007).

Most citrus (varieties and rootstocks) are $2X$ and only some natural polyploids such as *Fortunella hindsii*, Tahiti lime, and some citrus relatives were identified (Iwamasa et al., 1988).

Spontaneous $4X$ plants may arise in seedlings of apomictic genotypes, with a quite high frequency varying from 1 to 7% (Barret and Hutchinson, 1982 ; Saleh et al., 2008). Those plants are the result of a chromosome stock doubling of the nucellar tissues (Cameron and Soost, 1969), the rate of polyploid seedlings being dependant of physiological and environmental factors (Barrett and Hurtchinson, 1982). Polyploids present specific behaviour such smaller tree size associated to lower rates of whole plant transpiration, thicker leaves or greater cell size (Romero-Aranda et al., 1997). Stomata size increases in the meantime of the polyploidy status while the stomata density is decreased (Romero-Aranda et al., 1997). As well, the number of chloroplasts per cell and chlorophyll is increased in $4X$ when compared to $2X$ (Jellings and Leech, 1984 ; Warner et al., 1987). In polyploids, it is then possible that the increase of the cell volume and the number of chloroplasts per cell is a way to maintain higher rates of photosynthesis (Jellings and Leech, 1984 ; Warner et al., 1987). In ligneous plants, higher traits of tolerance to water deficit were also reported for $4X$, $5X$ and $6X$ such as plum

tree and paper birch relatively to their respective 2X (Puttovoitova et al., 1996 ; Li et al., 1996).

Polyploid genome expression in non stress condition has been tremendously investigated this last decade. In allopolyploid, numerous changes such as chromosomal rearrangement and change in gene expression may occur (Song et al., 1995 ; Feldman et al., 1997 ; Comai et al., 2000 ; Wang et al., 2006). Recently we investigated citrus 4X seedlings for salt stress tolerance when compared to their respective 2X parents (Saleh et al., 2000). 4X seedlings were observed to be more tolerant to salt stress than their respective 2X. However, the molecular determinisms of the greater tolerance to salt of those polyploids remained elusive because it is still difficult to separate mechanisms that regulate the expression of polyploid genomes and those specific to each 2X genotype that may lead to a higher salt stress tolerance.

In this work, we investigated the allotetraploid rootstock FLHORAG1 (Ollitrault et al. 2000), with its two 2X parents, trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) and Willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa*) and their respective doubled diploids in high salinity conditions. Our results suggest that in high salt stress conditions without water limitation, doubled diploids and the allotetraploids are not more tolerant than 2X. In such situation absorption of chloride and sodium ions in roots was not limited in 4X genotypes and all ions were transferred to leaves. Candidate gene expressions genes involved in salt stress tolerance were in agreement with the observed phenotypes.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Seedlings were provided by the INRA-CIRAD station of Corsica, France. Seedlings of Willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa*, SRA133) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) cv. Pomeroy, SRA 1074) as well as their allotetraploid somatic hybrid FLHORAG1 (Ollitrault et al., 2000) were grown in a mixture of sand, soil and peat (1:1:1) for 6 months in greenhouse. Identification of spontaneous doubled diploid plants among 2X was performed using flow cytometry. Genetic conformity checking (nucellar status of the plants) were performed using selected SSRs markers from Froelicher et al. (2008). Twelve 2X and 4X plants of each genotype were then selected and transplanted on the same substrate in 3 L pots and grown in greenhouse. Plants were irrigated twice a week with half diluted nutritive solution (fertilizer 28-14-14, ref 205, Fertil, France).

Salt stress experiment

10 uniformly sized seedlings aged of two years of each of the five genotypes were transferred and assigned at the random in 2 blocks in a growth chamber. Five were assigned to control treatment and the five others to salinity treatment. Salt stress was applied by watering plants daily at the same hour, either with 0.5L of water supplemented with half diluted nutritive solution for control plants, either with 0.5L of water supplemented with half diluted nutritive solution and salt. The concentration and the duration of salt applied was the following: 50 mM of NaCl for 2 weeks, 100 mM for 2 weeks, 200 mM for 2 weeks, and finally 400 mM for the last 2 weeks. Experiments were performed during the summer in greenhouse under natural photoperiod conditions, with minimum/maximum air temperatures of 15/19 and 24/29 °C at night and day, respectively, and relative humidity between 60 and 85 %.

Maximum quantum yield of PSII analysis, leaf water content and leaf thickness

Maximum quantum yield of Photosystem II, $[(F_m - F_0) / F_m]$, was monitored along the salt stress experiment at the same hour of the day using a fluorescence meter (Hansatech Ltd, Kings Lynn, UK). Maximum quantum yield of PSII was measured on three leaves of each genotype. Leaf water content was also carried out: five leaves per genotype were harvested and fresh and dry weights were measured. Prior to be dried, leaf thickness of each genotype was measured by using a micrometer (Mitutoyo, IP65, Japan).

Mineral analysis: sodium and chloride content

Leaves periodically harvested were dried and were used for chloride and sodium content analysis. Root samplings were also harvested at the end of the stress. Fractions were oven-dried at 60°C for one week, weighed, crushed in hammer-mill and stored at room

temperature. Sodium and chloride analyses were carried out according to Saleh et al. (2008). For leaves, sodium and chloride contents were expressed in $\mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ (taking account of leaf area and thickness) and in $\text{mg}.\text{g}^{-1}$ of dry material for roots. ICP assays were performed at CIRAD-PERSYST in Montpellier, France.

Gene expression: Real time RT-PCR analysis

Samplings for gene expression analysis were regularly performed (7-days, 21-d, 35-d, 49-d, 56-d). Each sampling was a mix of leaves from four trees. Samplings were kept at minus 80°C.

Total RNA were extracted from leaves collected after seven weeks (49-d) according to Chomczynski and Sacchi (1987). Primers of candidate genes (Table 1) that were studied using Quantitative real-time reverse transcription (qRT-PCR) were defined using the software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). qRT-PCR was performed with a LightCycler 2.0 0 instrument (Roche) equipped with LightCycler Software version 4.0 according to procedure described by Colemero-Flores et al. (2007). To transform fluorescent intensity measurements into fold change of gene expression, a 10-fold serial dilution of an RNA sample was used as the standard curve. Values were the mean of at least three independent analyses.

Statistical analysis

Data are expressed by the mean value \pm SE. We used SIGMASTAT from SPSS (Chicago; www.spss.com_software_science) to analyze the data. Student's t-test and ANOVA test were used to detect differences between the genotypes and the growing conditions at the usual probability level of $P = 0.05$.

RESULTS

Tetraploid generation and analysis of genetic constitution

Using flow cytometry, 4X were screened among 2X seedlings. Using SSRs markers, zygotic plants were removed in order to keep only nucellar plants for salt stress investigations. At one year, 4X plants were smaller than 2X. Plants were pruned in order to homogenise them. 10 two-years-old homogeneous plants of each genotype were selected for salt stress experiment.

Polyloid phenotypes under high salt stress condition

2X and 4X plants of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and FLHORAG1 were subjected to a progressive increasing salt stress (from 50 mM to 400 mM) for 56 days. Plants were watered each day with 0.5L of solution in order to get leaching from the pot of the exceeding solution. In those conditions, pots were maintained at the field capacity and the water potential applied was mostly dependant of the concentration of the salt solution. Leaf thickness and leaf water content was measured for control and stressed plants along the experiment. Along the experiment, the leaf water content of each genotype in control condition did not change more than 2% and was not significantly different (data not shown). On Table 2 are presented the leaf thickness and leaf water content in control and stressed plants measured the 49th day of the experiment. In control condition, 4X plants clearly presented a greater leaf water content and thicker leaves when compared to the respective 2X. After 49 days of stress, for all the genotypes, values of leaf water content and leaf thickness were the same or increased when compared to control conditions suggesting that no water limitation occurred. At the end of the salt stress experiment, Willow leaf genotypes presented symptoms of chlorosis and also trifoliate orange genotypes to a lesser degree but not FLHORAG1. Only, Willow leaf genotypes presented leaf fall. Symptoms of chlorosis and leaf fall were greater for 4X when compared to 2X. Monitoring of $(F_m - F_0)/F_m$, along the stress (Fig. 1) clearly shown that trifoliate orange and FLHORAG1 genotypes were slightly affected by the stress, no significant change being observed in between 2X and 4X. However, after 49 day of stress, 4X Willow leaf mandarins were very affected, $(F_m - F_0)/F_m$ being reduced of 50% when compared to 2X. Ion contents were monitored weekly for leaf samplings. An increase of chloride content when compared to control plants was observed after 35 days of stress. Taking account of the surface and the thickness of leaves for each genotype, 2X trifoliate orange presented the lower leaf chloride contents whereas 4X Willow leaf mandarins presented very large chloride contents, $27.2 \pm 6.0 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ corresponding to an equivalent of $68.6 \pm 14.7 \text{ mg}.\text{g}^{-1} \text{ DW}$. In any case, autotetraploids presented higher chloride content than their respective 2X. FLHORAG1 presented chloride contents similar to 4X trifoliate orange and 2X

Willow leaf mandarin. Leaf sodium content was as well investigated only the last day of the stress (Fig. 2). Trifoliolate orange genotypes, 2X Willow leaf mandarin and FLHORAG1 accumulated almost the same contents of sodium. Only 4X Willow leaf mandarin accumulated sodium at high level, a value of $24.7 \pm 5.3 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ corresponding to an equivalent of $62.9 \pm 5.3 \text{ mg}.\text{g}^{-1}$ DW being measured. The ultimate day of the stress, root chloride and sodium contents were investigated (Fig. 3). If a significant increase of the root chloride content was observed between control and stress conditions for trifoliolate orange genotypes and FLHORAG1, no change was observed for Willow leaf mandarin genotypes (Fig. 3A).

Investigation sodium contents in roots showed that trifoliolate orange genotypes and FLHORAG1 were accumulating the most (Fig. 3B). Analysis of the sodium/chloride content ratios in leaves shown that contents of sodium and chloride were very similar (ratios close to 1), whatever the studied genotype. However, 2.7 to 3.6 folds more sodium than chloride were found in roots (Table 3). Interestingly, in trifoliolate orange and Willow leaf mandarin genotypes, the leaf/root ratio of sodium and chloride were highly increased for autotetraploids when compared to 2X. FLHORAG1 presented sodium and chloride leaf/root ratios similar to its trifoliolate orange 2X parent.

Expression of candidate genes in 2X and 4X genotypes under high salt stress conditions

After 49 days of stress, a significant increase in chloride leaf content was observed for trifoliolate orange and Willow leaf genotypes as well for FLHORAG1 when compared to controls. We choose this date for genes expression analysis assuming that mechanisms for salt stress tolerance were triggered. RNA were prepared and the expression of candidate genes involved in salt stress tolerance was carried out by real time RT-PCR. The names of the genes and the sequences of the primers we used to monitor the gene expression by real time RT-PCR are presented in Table 1. First, we investigated the expression of genes encoding for transcription factors, *PAM1*, *RZFP* and *MYB8*, involved in salt stress signal transduction (Fig. 4). *PAM1* expression was shown not to be modified by the stress whatever the genotypes studied. FLHORAG1 inherited low expression profile similar to its trifoliolate orange parent (Fig. 4A). *RZFP* was clearly up regulated by the stress only in FLHORAG1 (Fig. 4B). *MYB8* was shown to be up regulated by the stress only in Willow leaf mandarin genotypes and FLHORAG1 (Fig. 4C). Transcriptional level of genes encoding for SOS3 Ca^{2+} sensor, and sodium and chloride transporter such as *SOS1*, *cNHX1* and *CCC12Ac* was also monitored (Fig. 5). *SOS3* that is known to interact physically with *SOS2* and activates *SOS1* Na^+/H^+ antiport was up-regulated in Willow leaf mandarin genotypes and FLHORAG1. Interestingly

the greater up-regulation was observed for 4X Willow leaf mandarin that was physiologically the more affected by the salt stress (Fig. 5A, 1 & 2). *SOS1* and *cNHX1* were clearly up-regulated by the stress in Willow leaf genotypes and FLHORAG1 (Fig. 5B & C). *CCC12Ac* was up-regulated overall the genotypes except in 2X trifoliolate orange (Fig. 5D). Encoding genes for enzymes such as CMO and P5CS involved respectively in biosynthesis of glycine-betaine and proline, or genes coding for cLEA5 were also studied (Fig. 6A, B & C). *CMO* was poorly expressed in trifoliolate orange genotypes and highly expressed in Willow leaf mandarin genotypes. Stressed FLHORAG1 was the only genotype that presented an up-regulation of *CMO* transcription (Fig. 6A). *P5CS* was up-regulated in almost all the genotypes but not in 2X trifoliolate orange. *cLEA5* was almost not expressed in trifoliolate orange genotypes while this gene was highly induced in stressed Willow leaf mandarin genotypes (Fig. 6B & C). In order to complete the overview of salt stress response, *NCED*, a gene involved in biosynthesis pathway of ABA was investigated (Fig. 6D). If this gene was up regulated overall the genotypes, a much greater up-regulation was observed in Willow leaf mandarin genotypes and FLHORAG1. To end, transcriptional level of genes encoding for detoxification enzymes such as catalase 2 and glutathione reductase were also studied. *CAT2* was shown to be down-regulated by the stress in almost the genotypes except FLHORAG1 which maintained its control transcriptional level. There was no change in *GR* expression for all genotypes.

DISCUSSION

In a recent study, we observed that 4X rootstocks are more tolerant to salt stress than their respective 2X (Saleh et al., 2008). When subjected to moderate salt stress 4X did not present any symptom of chlorosis as observed in some sensitive 2X genotypes. In this article, we investigated two autotetraploids genotypes when compared to their respective 2X and their allotetraploid in high salt stress conditions.

In order to induce phenotypes between the different genotypes a progressive increasing salt stress was applied. In citrus, high concentrations of toxic ions may be pull up from soil especially when ground water are polluted by sea water. In the high salt stress conditions we applied (400 mM of NaCl) leaf fall was observed only for Willow leaf mandarins, 4X being more affected than 2X. However, symptoms of chlorosis were observed for both Willow leaf mandarin and trifoliate orange genotypes but not for FLHORAG1. Monitoring of the maximum quantum yield of photosystem II has shown that trifoliate orange and FLHORAG1 photosynthetic activities were slightly affected by the stress (Fig. 1). On the contrary, Willow leaf mandarin that is supposed to be genetically close related to Cleopatra mandarin that is known to be chloride-excluder (Zekri and Parsons, 1992) and was then expected to be more tolerant than trifoliate orange genotypes, presented at the end of the stress a much lower $(F_m - F_0)/F_m$. In the literature, chloride ion is supposed to be the responsible of salt sensitivity in citrus (Romero-Aranda et al., 1998). Then we may consider that the lower values of $(F_m - F_0)/F_m$ observed for 4X Willow leaf mandarins is the result of the greater accumulation of chloride leading to leaf fall. Moreover, leaf sodium contents at end of the experimentation, were similar for almost all the stressed genotypes except for 4X Willow leaf mandarin that accumulated much more sodium. Interestingly, leaf sodium content of 2X trifoliate orange grown in salt stress condition was $5.3 \pm 0.4 \mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-3}$ (equivalent to $16.3 \pm 1.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$), a concentration that was yet very high suggesting that in high salt stress conditions, trifoliate orange was not anymore sodium excluder as it is proposed in the literature (Elgazzar et al., 1965 ; Zekri and Parsons, 1992). Analysis of chloride and sodium contents at the root level shown that trifoliate orange genotypes and FLHORAG1 accumulated both of them more ions than Willow leaf mandarin genotypes did. Taken together, the results of the present study suggest that in high salt stress condition with no water limitation, Willow leaf mandarin genotypes did not limit chloride and sodium absorption from the soil, and transferred directly the ions to leaves. Syvertsen et al. (2000) observed that citrus 4X had lower rates of whole plant transpiration suggesting that the control of stomata conductance may be the most important factor controlling the growth of polyploids. We may then suppose that the specific

manner to impose the salt stress associated to the specific anatomy of 4X such the greater cell size and the greater leaf thickness (Li and al., 1996; Xiong et al., 2006) were the main criteria leading to higher ions accumulation in leaves of 4X. Indeed, the greater leaf thickness and the higher leaf water content observed in stress conditions for all the 4X genotypes when compared to 2X suggests that in those stress conditions, even if the water potential was put down due to the high NaCl concentration applied, a transpiration stream was still occurring and a high rate of sodium and chloride was transferred to the leaves (Table 1).

Trifoliate orange 4X and the allotetraploid FLHORAG1 presented a greater leaf chloride and sodium accumulations than trifoliate orange 2X. The chloride and sodium leaf/root ratios were significantly increased in autotetraploid genotypes when compared to their respective 2X whereas ions leaf/root ratios of FLHORAG1 were very similar to 2X trifoliate orange suggesting that root ions accumulation for that genotype was preventing transport and accumulation of ions in the leaves (Table 2) and was limiting chlorosis and leaf fall. Under high salinity constraint, trifoliate orange is known to have the particularity of fine root turnover which could enable it to maintain a continuous root development, and thus to eliminate the excess of ions (Tozlu et al., 2000). Then we may expect that FLHORAG1 has inherited this particularity of its trifoliate orange parent.

Expression of candidate genes expressions in 2X and 4X genotypes under high salt stress conditions

In order to correlate physiological results with genomes expression, we investigated the expression of candidate genes involved at different step of the response to a salt stress. Among the three genes coding transcription factors we studied, *RZFP* and *MYB8* presented a clear up regulation in stressed FLHORAG1 (*RZFP*) or in stressed FLHORAG1 and Willow leaf mandarins (*RZFP* and *MYB8*), (Fig. 4B). In control condition gene expressions were usually similar between 2X and autotetraploid, the allotetraploid FLHORAG1 inheriting the gene expression profile of one of its two parents. In our hands, in control condition, most of the difference of gene expression profiles we observed happened in allotetraploid while very limited changes were observed in autotetraploid genotypes as previously observed by Adams et al. (2004).

Investigation of potato monoploid clone, 2X clones, and one 4X clone (Stupar et al. 2007) showed that gene expression changes was very limited in 4X. This suggests that autopolyploids derive all of their alleles from a single specie and may experience fewer alterations in their regulatory networks, resulting in fewer gene expression changes According to these authors, gene expression changes observed in between 2X and 4X genotypes could be

more likely attributed to nuclear dosage and ploidy-driven cellular modifications that may affect cell size, division rate, or organellar composition. However genome expression changes in allotetraploids is considered to be more affected by genome hybridization than by genome ploidy changes (Auger et al. 2005). According to Adams et al. (2003), allopolyploids are potentially advantaged because an increase of heterozygosity may be at the origin of subfunctionalization. After duplication, gene copies may become specialized to perform complementary functions (Ward & Durrett 2004). Hence, a partitioning of functions and/or expression patterns between duplicated genes may occur and may favor the adaptation to environmental changes.

Gene expression analyze of genes involved sodium and chloride compartmentation such as *SOS3*, *SOS1*, *cHNX1* and *CCCI2Ac*, clearly shown that all genotypes were affected by the stress (Fig. 6). As expected, 2X trifoliate orange that was slightly physiologically affected by stress, presented the slighter changes of genes expression for *SOS3*, *SOS1*, *cHNX1* genes while 4X Willow leaf mandarin that was severely physiologically affected by the stress presented the higher gene up regulation for those genes. Interestingly, genotypes that were the most affected did not more express *CCCI2Ac* that was shown to be involved in chloride long-distance transport (Colemero Flores et al, 2007). However, in high salinity condition, it is possible that diffusive mechanisms through the apoplast may also constitute important pathways for chloride uptake in citrus plants as previously proposed (Moya et al., 2003) and then may favour chloride transport to the leaves through the transpiration flux.

Transcriptional levels of genes involved in osmoticum biosynthesis (*CMO*, *P5CS*) and *cLEA5* chaperon protein were also investigated. In stress condition, if *CMO* transcription was only induced in FLHORAG1, *cLEA5* being highly induced in Willow leaf mandarin genotypes while *P5CS* was up-regulated overall the genotypes except in 2X trifoliate orange. *NCED* gene expression profile showed an increase for all the genotypes, the larger change of expression being observed for Willow leaf mandarin genotypes ((Fig. 6D). *NCED* expression will lead to ABA biosynthesis and stomata closure. Moreover, ABA accumulation in leaves further to abiotic stresses or exogenous ABA application induced *P5CS* and *LEA* genes expression (Dure, 1993 ; Hudertmark and Hinch 2008). While *NCED* was slightly expressed in trifoliate orange, no expression of *cLEA5* was observed. However, for Willow leaf mandarin genotypes and FLHORAG1 the expression of *cLEA5* and *P5CS* was well correlated to the transcriptional level of *NCED*. At high salinity concentration (greater than 150 mM of NaCl), it has been reported that gene coding CAT2 was down regulated (Feierabend et al., 1992 ; Ferreira et al., 2004). As expected, genes coding for CAT2 were shown to be down-

regulated whereas no change of expression was observed for GR (Fig. 7A & B). Investigation of ROS contents and detoxification enzymes in 4X *Dioscorea zingiberensis* indicated that 4X plants possessed a stronger antioxidant defense system and increased heat tolerance (Zhang et al., 2009). Then, it would be required to study also oxidative stress in citrus 4X. Indeed, a stronger antioxidant defense system in FLHORAG1 may explain why no symptom of leaf chlorosis was observed compared 4X trifoliate orange while chloride and sodium leaf accumulation were similar for both genotypes.

Taking together gene expression changes fitted with the physiological phenotypes we observed. At the end of the stress, we measured very large amounts of sodium and chloride in roots and leaves, associated with leaf chlorosis symptoms in Willow leaf genotypes and to a lesser degree in trifoliate orange genotypes but not in FLHORAG1. Leaf fall was observed only for Willow leaf genotypes. The high ions accumulations suggested that the transpiration flow was not limited along the stress and ions were highly transported in the whole plant inducing leaf damages. In those conditions, because of their specific anatomy, autotetraploid were disadvantaged when compared to their respective 2X. If a greater limitation of gas exchanges through stomates would have occurred during the stress, we may have expected that the transport of toxic ions would have been more limited. However, the great uptake of those ions associated to the alteration of the photosynthesis concomitant to the synthesis of oxygen species led rapidly to symptoms of chlorosis. In moderate salt stress conditions with plants watered twice a week, we observed that 4X plants were more tolerant than 2X (Sahle et al. 2008). We may expect that in such conditions, plants experienced a salt stress associated to water deficit leading to a better regulation of gas exchanges and to a more limited uptake of ions. Then, in order to confirm the possible interest of the use of polyploid rootstock for the citrus industry it will be required to test 4X seedlings in water deficit condition. If a greater tolerance of 4X to water deficit would be confirmed, we may assume that in the field, when subjected to salt stress, a greater tolerance of 4X will be observed since salt stress is most of the time associated with water limitations. As well, it would be also interesting to study autotetraploid rootstocks and allotetraploid genotypes such as FLHORAG1 when grafted to confirm the interest of 4X as a new source of rootstocks for the citrus industry.

FUNDING

Comité Mixte Inter Universitaire Franco-Marocain” (Programme Volubils, MA/05/137) to W M and European “INCO” project (FP6 – 2003 - INCO – DEV – 2 n° 015453) to T. A.

Interreg IIIA program, Ministerio de Educacion y Ciencia, AGL 2007-65437-C04-01/AGR, European “INCO” project (FP6 – 2003 - INCO – DEV – 2 n° 015453).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank C. Jacquemond, F. Curk (Unité GEQA, INRA, San Giuliano, France) for providing 2X seedlings.

REFERENCES

- Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel J F 2003 Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4649–4654.
- Adams K.L., R. Percifield and J.F Wendel. 2004. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics*. 168 : 2217–2226.
- Adams, K. L. and J. F. Wendel. 2005. Allele-specific, bi-directional silencing of an alcohol dehydrogenase gene in different organs of interspecific diploid cotton hybrids. *Genetics*. 171 : 2139-2142.
- Auger DL, Gray AD, Ream TS, Kato A, Coe EH Jr, Birchler JA 2005 Nonadditive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize. *Genetics* 169: 389–397.
- Apse M. P., Aharon G. S., Snedden W. A. and Blumwald E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*. 285 : 1256-1258.
- Bañuls, J. and E. Primo-Millo. 1995. Effect of salinity on some citrus scion-rootstock combinations. *Ann. Bot.* 76 : 97-102.
- Bañuls J., Serna, M.D., M. Legaz and E. Primo-Millo. 1997. Growth and gas exchange parameters of citrus plants stressed with different salts. *J. Plant Phys.* 150 : 194-199.
- Barrett, H.C. 1985. Hybridization of citrus and related genera. *Fruit Varieties J.*, University Park, 39 : 11-16.
- Barrett, H.C. and D.J. Hutchinson. 1982. Occurrence of spontaneous octoploidy in apomictic seedlings of a tetraploid *Citrus* hybrid. *Proc. Int. Soc. Citric.* 1 : 29-30.
- Cameron, J.W. and R.K. Soost. 1969. Characters of new populations of *Citrus* polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny, in: H.D. Chapman (Eds.), *Proc. Int. Citric. Symp.*, University of California at Riverside 1 : 199–205.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156-9.
- Colmenero-Flores J. M., Martinez G., Gamba G., Vazquez N., Iglesias D. J., Brumos J., Talon M. 2007. Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant Journal*. 50 : 278-292.
- Comai L., Tyagi A. P., Winter K., Holmes-Davis R., Reynolds S. H., Stevens Y., and Byers B. 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell*. 12 : 1551-1567.
- Cooper W.C. and B. S. Gorton. 1952. Toxicity and accumulation of chloride salts in *citrus* on various rootstocks. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 59 : 143-146.

- Dai X., Xu Y., Ma Q., Xu W., Wang T., Xue Y., and Chong K. 2007. Overexpression of a R1R2R3 MYB Gene, OsMYB3R-2, Increases Tolerance to Freezing, Drought, and Salt Stress in Transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology Preview*, DOI:10.1104/pp.106.094532.
- Davenport S. V., Gallego S. M., Benavides M. P. and Tomaro M. L. 2004. Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation*. 40 : 81-88.
- Dure L. III. 1993. A repeating 11-mer amino acid motif and plant dessication. *Plant Journal*, 3 : 363-369.
- Elgazzar A., A. Wallace and N. Hemaidan. 1965. Sodium distribution in rough lemon and trifoliate orange seedlings. *Soil Sci*. 99 : 387-391.
- Feierabend J., Schaen C., Hertwig B. 1992. Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiology*, 100 : 1554-1561.
- Ferrera A. L., Ferreira S., Duarte A. and Lima-Costa M. E. 2004. Antioxidative response to salt stress in different NaCl-tolerant citrus cell lines. *Proceedings of the International Society of Citriculture II*, 634-638.
- Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S., Levy A. A. and Vega J. M. 1997. Rapid elimination of Low-Copy DNA sequences in polyploidy wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics*. 147 : 1381-1387.
- Froelicher Y., Dambier D., Bassene J.B., Costantino G., Lotfy S., Didout C., Beaumont V., Brottier P., Risterucci A-M., Luro F., and Ollitrault P. 2008. Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco), *Mol. Ecol. Res.* 8 19-122.
- Guo Y., Qiu Q. S., Quintero F. J., Pardo J. M., Ohta M., Zhang C., Schumaker K. S., Zhua J. K. 2004. Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16 : 435-449.
- Hundertmark M. and Hinch D. K. 2008. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9 : 118.
- Iwamasa, M., Nito, N. and J.T. Ling, Intra and intergeneric hybridization in the orange subfamily, *Aurantioideae*, *Proc. Int. Citric. Cong.*, Goren and Mendel (Eds.), Philadelphia (1988) 123-130.
- Jellings, A.J. and R.M. Leech. 1984. Anatomical variation in first leaves on nine Triticum genotypes and its relationship to photosynthetic capacity. *New Phytol.* 96 : 371-382.
- Li, W.L., G.P. Berlyn and M.S Ashton. 1996. Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *Betula papyrifera* (*Betulaceae*). *Am. J. Bot.* 83 : 15-20.

- Moons A., Bauw G., Prinsen E., Van Montagu M., Straeten D. V. D. 1995. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties. *Plant Physiology*, 107 : 177-186.
- Moya, J.L., Gomez-Cadenas, A., E. Primo-Millo and M. Talon. 2003. Chloride tolerance in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water usage, *J. Exp. Bot.* 383 : 825-833.
- Naot D., Ben-Hayyim G., Eshdat Y. and Holland D. 1995. Drought, heat and salt stress induce the expression of a citrus homologue of an atypical late-embryogenesis Lea5 gene. *Plant Molecular Biology*, 27 : 619-622.
- Ollitrault, P., Dambier, D., M. Seker and Y. Froelicher. 2000. Rootstock breeding by somatic hybridisation for the Mediterranean citrus industry. *Acta Horticulturae*. 535 : 157-162.
- Pustovoitova, T.N., Eremin, G.V., Rassvetaeva, E.G., N.E. Zhdanova and V.N. Zholkevich. 1996. Drought resistance, recovery capacity, and phytohormone content in polyploid plum leaves. *Russian J. Plant Phys.* 43 : 232-235.
- Rodrigo M. J., Alquezar B., Zacarías L. 2006. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Experimental Botany*, 57 : 633-643.
- Romero-Aranda R., Bondada B. R., Syvertsen J. P., Grosser J. W. 1997. Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autotetraploid Citrus. *Annals of Botany*, 79 : 153-160.
- Romero-Aranda, R., Moya, J.L., Tadeo, F.R., Legaz, F., E. Primo-Millo and M. Talon. 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant, Cell and Env.* 21 : 1243-1253.
- Sakamoto A. and Murata N. 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environment*, 25 : 163-171.
- Saleh B., Allario T., Dambier D., P. Ollitrault and R. Morillon. 2008. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *C. R. Biol.* 331 : 703-710.
- Shi H., Lee B-H., Wu S-J., Zhu J-K. 2003. Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21 : 81-85.
- Song K., Lu P., Tang K., and Osborn T. C. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploidy evolution. *Proceedings of National. Academy of Science*. 92 : 7719-7723.

- Stupar RM, Bhaskar PB, Yandell BS, Rensink WA, Hart AL, Ouyang S, Veilleux RE, Busse JS, Erhardt RJ, Buell CR, Jiang J. 2007. Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* 176: 2055–67.
- Subbarao G. V., Wheeler R. M., Levine L. H. and Stutte G. W. 2001. Glycine betaine accumulation, ionic and water relations of red-beet at contrasting levels of sodium supply. *Journal of Plant Physiology*. 158 : 767-776.
- Syvertsen J.P., L.S. Lee and J.W. Grosser 2000. Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO₂. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 125 : 228-234.
- Tozlu I., Moore G. A., Guy C. L. 2000. Effects of increasing NaCl concentration on stem elongation, dry mass production, and macro- and micro-nutrient accumulation in *Poncirus trifoliata*. *Plant Physiology*, 27: 35-42.
- Ueda A., Kathiresan A., Inada M., Narita Y., Nakamura T., Shi W., Takabe T. and Bennett J. 2004. Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. *J.Exp. Bot.* 55 : 2213-2218.
- Wang, J., Tian, L., Lee, H-S, Wei, N., Jiang, H., Watson, B., Madlung, A., Osborn, T., Doerge, R. D., L. Comai and Z. J. Chen. 2006. Genome-wide Non-additive Gene Regulation in Arabidopsis Allotetraploids . *Genetics*. 172 : 507-517.
- Ward R, Durrett R. 2004. Subfunctionalization: How often does it occur? How long does it take? *Theor Pop Biol* 66: 93–100.
- Warner, D.A., M.S.B. Ku and G.E. Edwards. 1987. Photosynthesis, leaf anatomy, and cellular constituents in polyploidy C₄ grass *Panicum virgatum*. *Plant Physiol.* 84 : 461-466.
- Xiong Y-C, F-M. Li and T. Zhang. 2006. Performance of wheat crops with different chromosome ploidy : root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. *Planta*. 224 : 710-718.
- Zhang XY, Hu CG, Yao JL. 2009. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *J Plant Physiol*, doi:10.1016/j.jplph.2009.07.006.
- Zekri M. and L.R. Parsons. 1992. Salinity tolerance of *citrus* rootstocks: Effect of salt on root and leaf mineral concentrations, *Plant Soil*. 147 : 171-181.

Table captions

Table 1. Sequences of the primers used to monitor by real time RT-PCR the expression of candidate genes.

Name	Protein encoded by the targeted gene	Sequence of the Forward primer (5' -> 3')	Sequence of the Reverse primer (5' -> 3')	mRNA origin	Accession number	Size of the product of amplification (bp)	Tm
PAM1	Protein Arginine N-MethylTransferase	gatatgctctccgaccgtgt	ttcaacggcataaaccttcc	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AJ007582	161	55
RZFP	Ring H ₂ -Zinc Finger Protein	agccacttctccaagcacac	gttgaggagttccgaaacca	<i>Poncirus rubidoux</i>	aCL198Contig1	170	56
MYB8	MYB8 transcription factor	gaagtggatcgatcaaagg	gtgctcgactgaggtgaca	<i>Citrus sinensis</i>	aCL891Contig1	174	56
SOS3	Calcium protein sensor	tctttccaggctcttcttc	ggaccatggggtttttatga	<i>Oryza sativa</i>	DQ201198	173	54
cNHX1	Antiport vacuolaire Na ⁺ /H ⁺	gcgggaaaacgctattatga	agtggctgcgacagagattt	<i>Citrus paradisi</i>	AY028416	171	54
SOS1	Antiport membranaire Na ⁺ /H ⁺	tctttccaggctcttcttc	ggaccatggggtttttatga	<i>Citrus clementina</i>	aIC0AAA94AC03RM1_c	173	52
CCC12Ac	Transporteur de Cl ⁻	gtagggatggtgaagatgc	aagctaccaccaataacgag	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_001036913	183	53
CMO	Choline MonoOxygenase	gcaactggaaggttttctgc	caaggcgatgggtatcatct	<i>Citrus reticulata</i> x <i>C. temple</i>	aC32201B02EF_c	180	55
cLEA5	Group 5 Late Embryogenesis Abundant	acccttggggaccatatctc	ctctcgaaagctctgctggat	<i>Citrus unshiu</i>	aCL9Contig8	166	57
P5CS	Delta 1 Pyrolline 5 Carboxylate Synthetase	atgtgcgtgctgctattgac	agtccaaatcgtgccatc	<i>Citrus sinensis</i>	aCL174Contig2	166	55
NCED	9 Cis Epoxycarotenoid Dioxygenase	gaccagcaagtgggttcaa	agaggtggaacaggagcaa	<i>Citrus cv. Shiranuhi</i>	aCL1933Contig1	163	55
CAT2	Catalase 2	accgtctagggccgaactat	ttcaggaggagttggatgc	<i>Citrus sinensis</i>	aCL63Contig2	174	53
GR	Glutathione Reductase cytosolique	ggaggagctacaaaacgtg	tgctggatttcagatgcttg	<i>Oryza sativa</i>	NM_001055020	179	55

Table 2. Leaf water content and leaf thickness of diploid and autotetraploid of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and the allotetraploid, FLHORAG1, grown in control and after 49 days of salt stress. For leaf thickness and leaf water content, values (Mean value \pm SE) with a different letter were significantly different ($P < 0.05$).

	Trifoliate orange		Willow leaf mandarin		FLHORAG1
	2X	4X	2X	4X	4X
Leaf thickness	0.284 \pm 0.010	0.340 \pm 0.009	0.247 \pm 0.014	0.297 \pm 0.012	0.298 \pm 0.008
Control condition (mm)	ab	c	a	b	b
Leaf thickness	0.314 \pm 0.007	0.352 \pm 0.007	0.314 \pm 0.007	0.301 \pm 0.014	0.304 \pm 0.006
Stress condition (mm)	bc	c	bc	bc	b
Leaf water content	56,68 \pm 1.24	60,62 \pm 0.37	61,48 \pm 0.36	68,30 \pm 0.70	64,77 \pm 0.42
Control condition	a	b	bc	de	d
(% of fresh weight)					
Leaf water content	56,95 \pm 0.31	62,86 \pm 0.83	65,76 \pm 0.89	69,77 \pm 1.45	67,33 \pm 0.67
Stress condition	a	c	d	e	de
(% of fresh weight)					

Table 3. Sodium /chloride content ratio in leaf and root for diploid and autotetraploid of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and their allotetraploid, FLHORAG1. Leaf / root ratio of sodium and chloride for the same genotypes.

		Trifoliate orange		Willow leaf mandarin		FLHORAG1
		2X	4X	2X	4X	4X
Sodium / Chloride ratio	Leaf	0,89	0,88	1,08	0,92	1,01
	Root	2,85	2,96	3,61	2,72	3,19
Leaf / Root ratio	Na ⁺	2,03	3,07	9,08	17,59	2,15
	Cl ⁻	6,47	10,35	30,49	52,17	6,81

Figure captions

Figure 1: Maximum quantum yield of the photosystem II $[(F_m - F_0)/F_m]$ measured along height weeks of salt stress on diploid and autotetraploid plants of trifoliate orange (A), Willow leaf mandarin (B) and on the allotetraploid FLHORAG1 (C). Leaf Chloride contents were as well measured along the same period for the same genotypes (D, E, F). Leaf chloride contents were expressed in $\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-3}$ in order to take account of leaf thickness. (●: 2X / control condition ; ○: 2X / stress condition ; ▼: 4X / control condition ; ▽: 4X / stress condition). Values (Mean value \pm SE) with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Figure 2: Leaf sodium contents measured after 8 weeks of salt stress from diploid and autotetraploid plants of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and on the allotetraploid FLHORAG1. Leaf sodium contents were expressed in $\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-3}$ in order to take account of leaf thickness. Vertical bars indicate the mean value \pm SE, values corresponding to stressed plants with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Figure 3: Root chloride (A) and sodium (B) contents measured after 8 weeks of salt stress from diploid and autotetraploid plants of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and on the allotetraploid FLHORAG1. Chloride and sodium contents were expressed in $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ dry weight. Vertical bars indicate the mean value \pm SE, values corresponding to stressed plants with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Figure 4: Relative change of mRNA presence coded by genes of Protein Arginine n-Methyltransferase, PAM1 (A), ring-type Zinc Finger Protein, RZFP (B) and MYB8 Transcription factor, MYB8 (C). RNA were prepared from sampling harvested after seven weeks of stress when significant changes of maximum quantum yield of PSII and chloride contents values were observed. Vertical bars indicate the mean value \pm SE. For each genotype, a star indicates a significant change of gene expression (t test) between control and stress condition ($P < 0.05$).

Figure 5: Relative change of mRNA presence coded by genes of Calcium sensor protein SOS3 (A), Plasma membrane Na^+/H^+ antiport, SOS1 (B), Vacuolar Na^+/H^+ antiport, cNHX1 (C), and Chloride transporter, CCC12ac (D). RNA were prepared from sampling harvested after seven weeks of stress. Vertical bars indicate the mean value \pm SE. For each

genotype, a star indicates a significant change of gene expression (t test) between control and stress condition ($P < 0.05$).

Figure 6: Relative change of mRNA presence coded by genes of Choline MonOxygenase, CMO (A), Δ 1-Pyrroline-5-Carboxylase-Synthetas, P5CS (B), 5-Late Embryogenesis Abundant Protein, cLEA5 (C), and 9-Cis –Epoxycarotenoid-Dioxygenase, NCED (D). RNA were prepared from sampling harvested after seven weeks of stress. Vertical bars indicate the mean value \pm SE. For each genotype, a star indicates a significant change of gene expression (t-test) between control and stress condition ($P < 0.05$).

Figure 7: Relative change of mRNA presence coded by genes of Catalase 2, CAT2 (A) and Glutathion Reductase, GR (B). RNA were prepared from sampling harvested after seven weeks of stress. Vertical bars indicate the mean value \pm SE. For each genotype, a star indicates a significant change of gene expression (t test) between control and stress condition ($P < 0.05$).

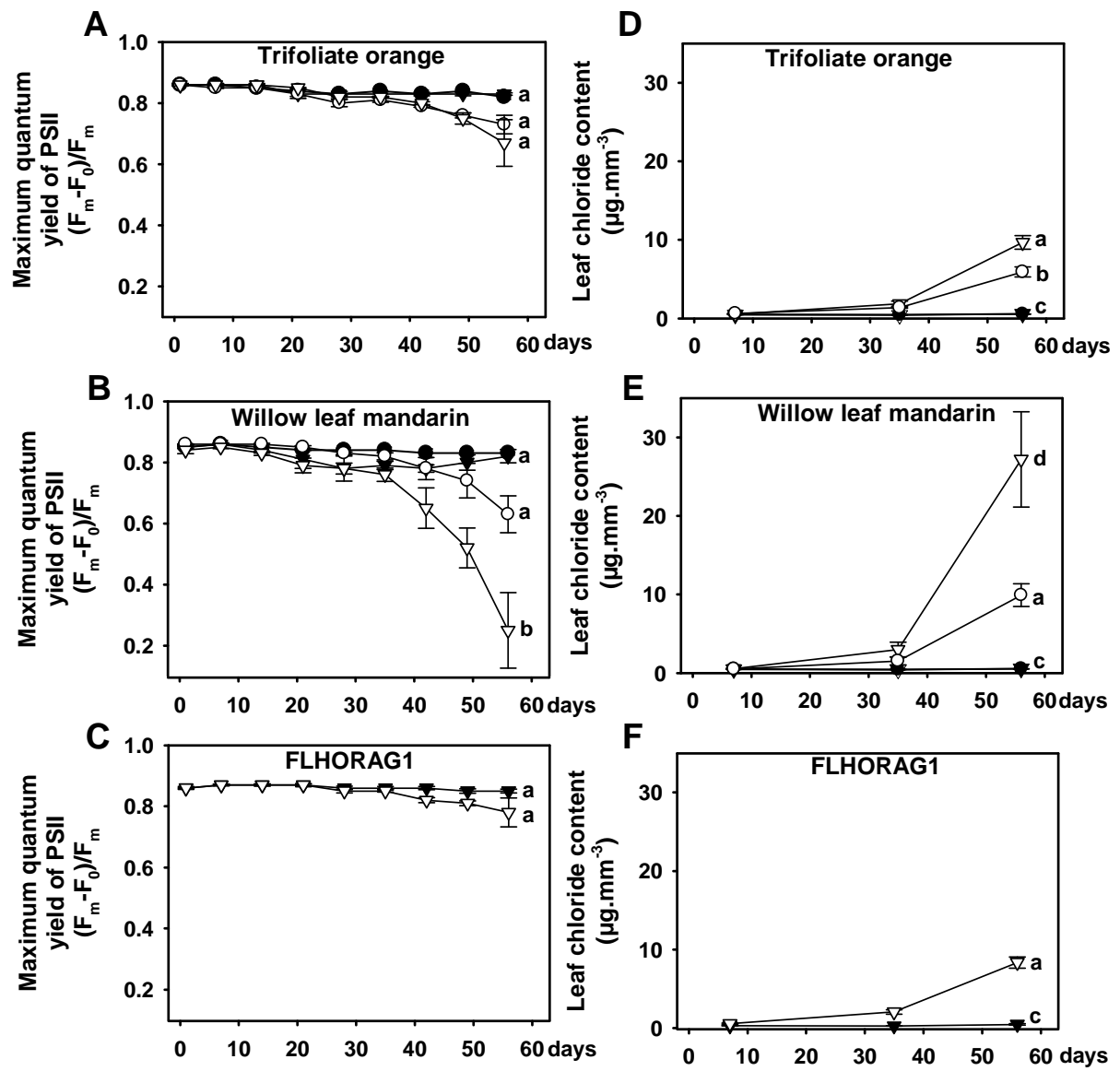


Fig. 1

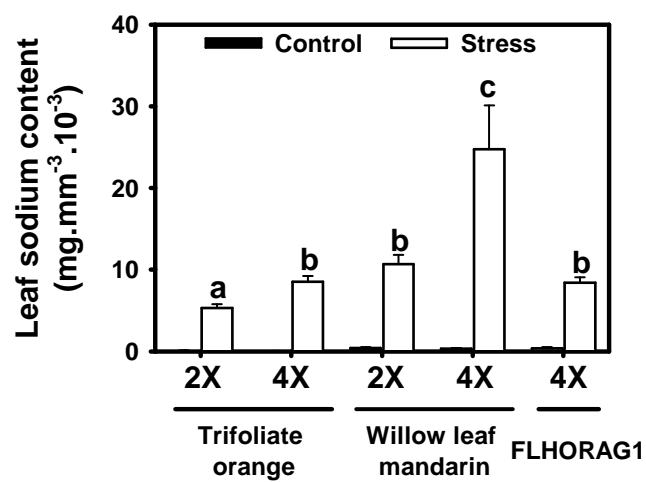


Fig. 2

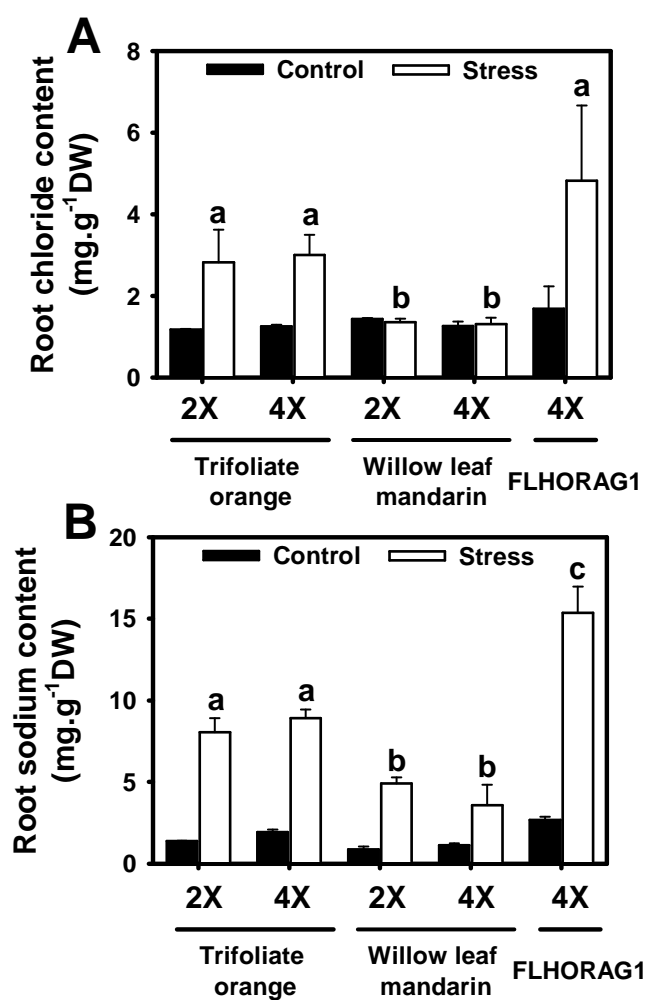


Fig. 3

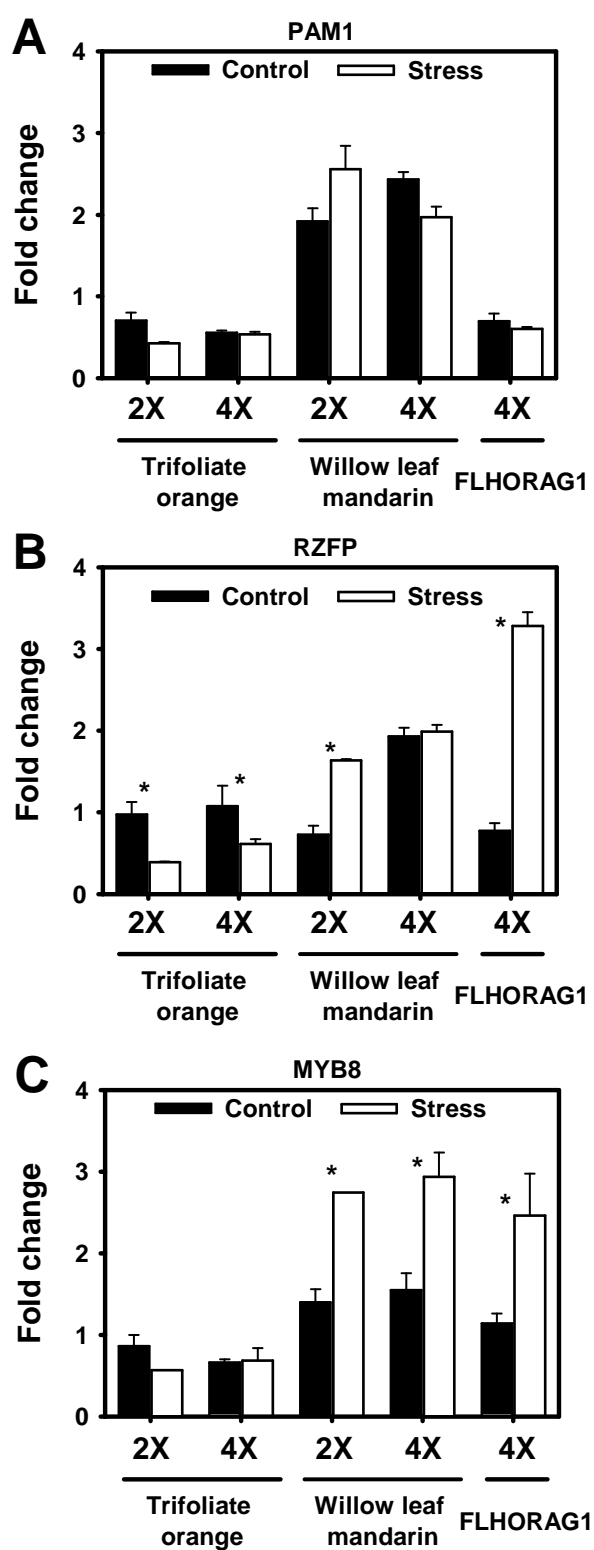


Fig. 4

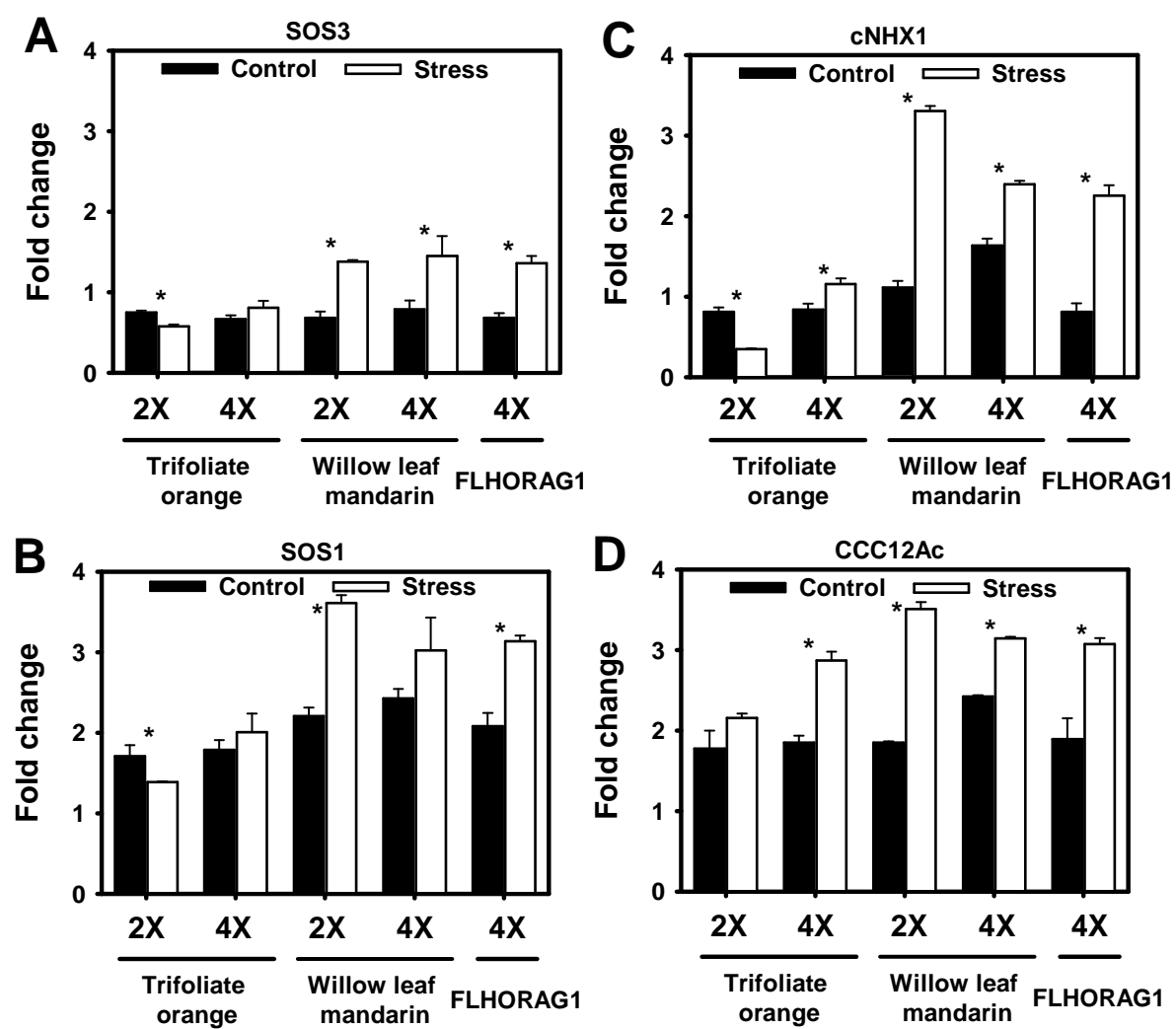


Fig. 5

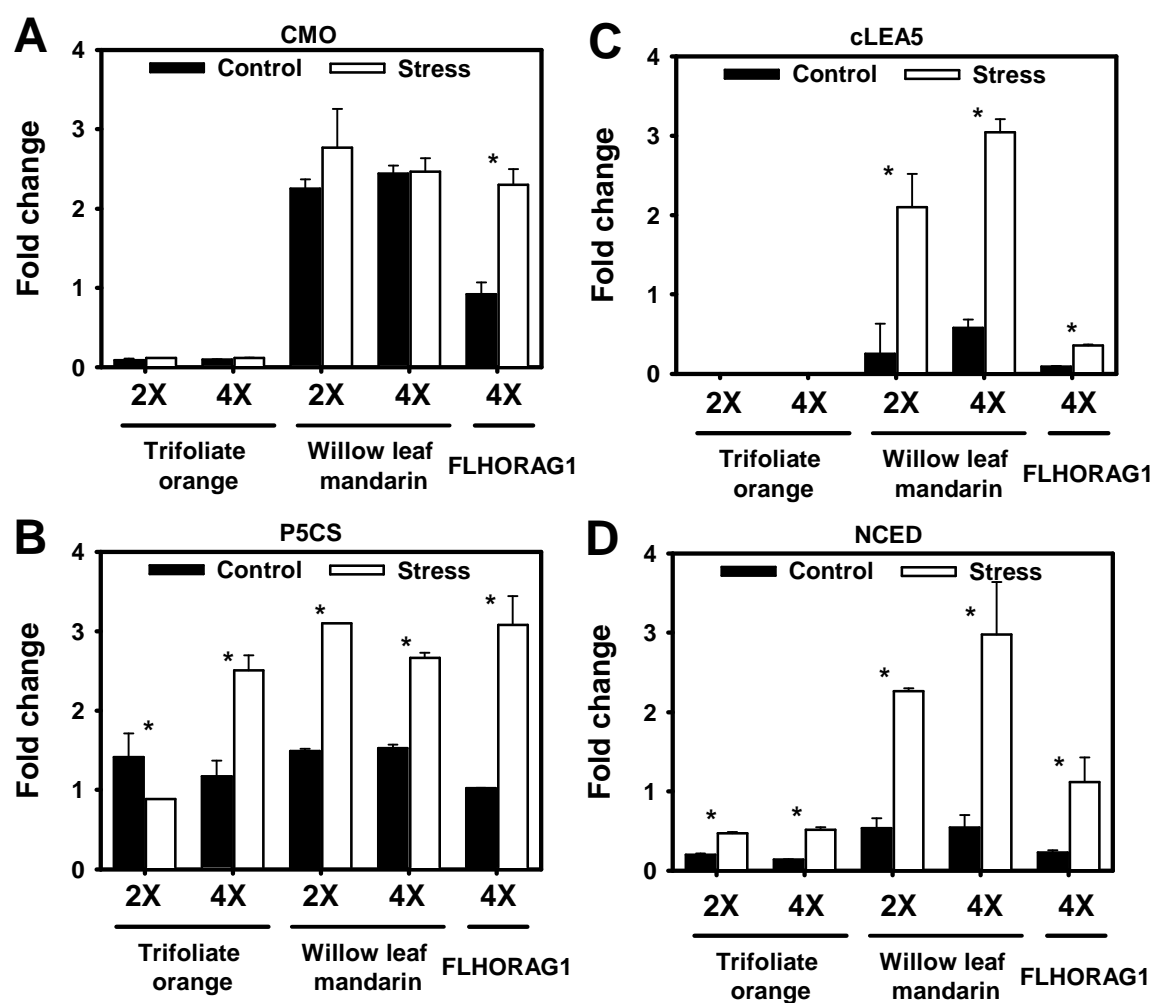


Fig. 6

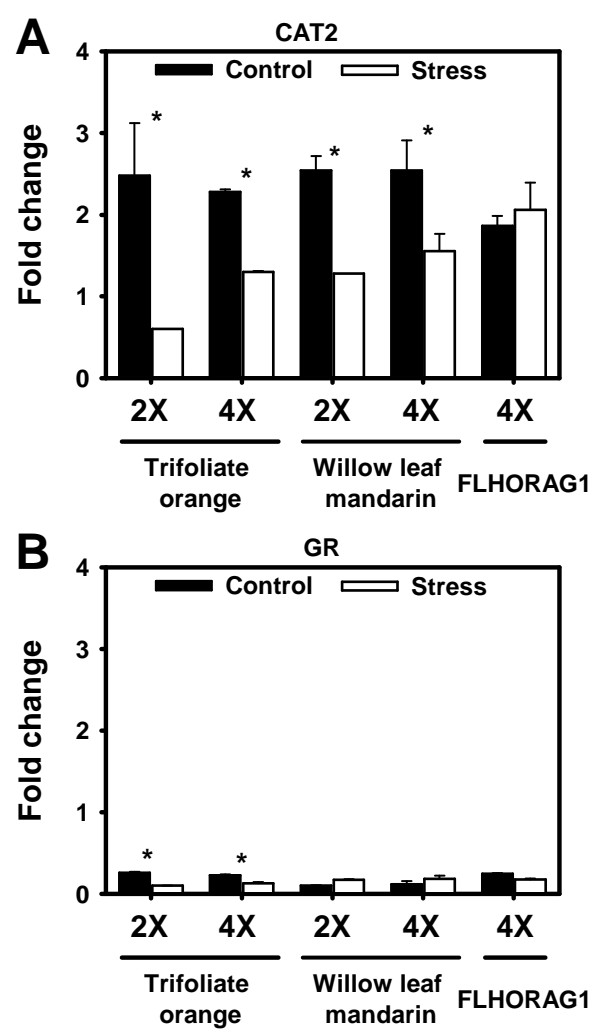


Fig. 7

4.3. ETUDE DU COMPORTEMENT PHYSIOLOGIQUE DES PORTE-GREFFES TETRAPLOIDES ET DIPLOIDES FACE AU STRESS SALIN

4.3.1. Les porte-greffes FLHORAG1 allotétraploïdes et *Poncirus trifoliata* autotétraploïdes et diploïdes greffés avec le clémentinier commun ou le cédratier Etrog

Si la tolérance au stress salin des variétés autotétraploïdes est contrastée en fonction des modalités de stress (cf Art. 1 et 2), il semble que celle de l'allotétraploïde FLHORAG1 soit meilleure. Les parties aériennes des plants franc-de-pieds autotétraploïdes étant morphologiquement différentes, elles influent sur les capacités de tolérance des plants comme cela a été observé dans l'article 2. Il est donc nécessaire de connaître l'impact que peut avoir le greffage d'une variété diploïde sur un porte-greffe autotétraploïde lors d'un stress salin et de confirmer, ou d'infirmer, l'intérêt que peut avoir l'utilisation des plants autotétraploïdes en tant que porte-greffe. Dans le but de déterminer la tolérance des porte-greffes tétraploïdes d'agrumes, deux variétés, l'une connue pour être sensible au stress salin, le cédratier, et l'autre connue pour être tolérante au stress salin, le clémentinier SRA92, ont été greffées sur *Poncirus trifoliata* autotétraploïde et diploïde, ainsi que sur l'hybride allotétraploïde FLHORAG1 (cf Tableau 8). Dans les mêmes conditions expérimentales que celles exposées dans l'article 2, ces porte-greffes ont été évalués sous l'effet d'un stress salin progressif de 50 mM à 400 mM avec un arrosage quotidien afin de limiter, par lixiviation, l'accumulation des ions dans le substrat. L'arrosage effectué quotidiennement à la capacité au champ a également permis de limiter l'abaissement du potentiel hydrique du substrat : le potentiel hydrique du substrat était alors proche de la concentration de la solution saline appliquée. Le contenu en eau des feuilles des plants stressés était similaire aux plants témoins (cf Figure 15 D), suggérant que le flux transpiratoire a été maintenu tout au long de l'expérience et que les plants n'ont pas eu à souffrir d'une limitation en eau. Par conséquent, il peut être supposé que les effets du stress observés chez ces plants étaient surtout le résultat de la présence des ions.

Les mesures de fluorescence chlorophyllienne n'ont pas permis de mettre en évidence de différences entre plants greffés sur *Poncirus trifoliata* autotétraploïdes et plants greffés sur *Poncirus trifoliata* diploïdes (cf Figures 14 B et D) comme cela avait pu être observé chez les plants francs de pieds étudiés dans l'article 2. Cependant, les plants greffés sur FLHORAG1, qu'il s'agisse du cédratier ou du clémentinier commun, ont été fortement affectés par le stress salin (cf Figures 14 A et C) alors que le FLHORAG1 franc-de-pied avait bien résisté à ces mêmes conditions (cf Art.2). Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle le

FLHORAG1 franc-de-pied présenterait une tolérance accrue du fait de ses parties aériennes capables de développer des défenses plus efficaces lors d'un stress salin. Les racines du FLHORAG1 limiteraient très peu le passage des ions, véhiculés via le flux transpiratoire jusqu'aux feuilles du greffon, lorsqu'il est greffé avec le cédratier ou avec le clémentinier commun. Cette sensibilité peut être corrélée à la quantité de chlorures et de sodiums mesurée dans les feuilles en fin d'expérience, soit respectivement $11,36 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ et $8,90 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ dans les feuilles du cédratier greffé sur FLHORAG1, et $14,49 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ et $12,19 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ dans les feuilles du clémentinier SRA92 greffé sur FLHORAG1 (*cf* Figures 14 E et G, Figure 15 A). Les concentrations foliaires en ions chlorures et sodiums du cédratier et du clémentinier SRA92 greffés sur *Poncirus trifoliata* autotétraploïde (respectivement de $6,43 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ et $5,58 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ chez le cédratier et de $6,40 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ et $6,46 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ chez le clémentinier SRA92) ou diploïde (respectivement de $4,51 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ et $3,64 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ chez le cédratier et de $6,42 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ et $6,16 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ chez le clémentinier SRA92) étaient similaires (*cf* Figures 14 F et H, Figure 15 A). De même, aucune différence significative n'a pu être observée concernant les quantités en chlorures et en sodiums mesurées entre les racines autotétraploïdes et les racines diploïdes (*cf* Figures 15 B et C). L'étude de la distribution des ions chlorures et sodiums entre la feuille et la racine montre que l'accumulation des ions se fait principalement dans les feuilles (*cf* Figure 15 E). Ceci s'explique par le fait que les ions sont entraînés vers les parties aériennes via la sève sous l'effet de la transpiration (Cooper, 1961 ; Bañuls et PrimoMillo, 1992 ; Moya *et al.*, 2003). Cependant, si les concentrations d'ions sodiums sont de 1,48 fois (cédratier greffé sur *Poncirus trifoliata* diploïde) à 4,26 fois (clémentinier SRA92 greffé sur *Poncirus trifoliata* diploïde) plus importantes pour la feuille que pour la racine, ce facteur est beaucoup plus considérable concernant les quantités d'ions chlorures, puisque leur concentration dans la feuille est estimée de 5,82 fois (cédratier greffé sur *Poncirus trifoliata* diploïde) à 12,45 fois (cédratier greffé sur FLHORAG1) celle mesurée dans la racine. Ceci suggère que les ions sodiums sont partiellement retenus au niveau de la racine. Effectivement, pour de faibles concentrations en NaCl, le *Poncirus trifoliata* est capable d'exclure le sodium (Zekri et Parsons, 1992) : cette propriété pourrait avoir été transmise au FLHORAG1 par son parent *Poncirus trifoliata*. Dans la racine, il est compté en moyenne de 2,3 (clémentinier SRA92 greffé sur FLHORAG1) à 3,2 (cédratier greffé sur *Poncirus trifoliata* diploïde) Na^+ pour 1 Cl^- , alors que ce rapport Na^+/Cl^- , tous génotypes confondus, est légèrement inférieur à 1 dans la feuille (*cf* Figures 15 E et F). La charge négative des ions Cl^- limiterait leur diffusion au travers des membranes plasmiques des cellules (*cf* §1.5.3.). Par conséquent, le passage des ions Cl^- au travers des tissus de la racine serait plus difficile que pour les ions Na^+ , car le

passage de la ceinture de Casparie force le transit de tous les solutés par la voie transmembranaire (Enstone *et al.*, 2002; Ma et Peterson, 2003; Karahara *et al.*, 2004). Bien que le potentiel de charge de la membrane soit favorable à son passage, le Na^+ est contraint d'emprunter les canaux normalement dévolus aux K^+ pour la traverser. Cependant, la cellule est équipée de mécanisme d'exclusion des Na^+ tel que le SOS1 de la membrane plasmique et le AtNHX du tonoplaste (Apse *et al.*, 1999; Guo et Tang, 1999; Zhu, 2002; Qi et Spalding, 2004). De même, le Cl^- peut également pénétrer la cellule par l'intermédiaire de canaux tel que le co-transporteur $\text{K}^+/\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ CCC récemment décrit par Colmenero-Flores *et al.*, (2007). Les différences de rapport Na^+/Cl^- observées au niveau de la racine pourraient être la conséquence de mécanismes d'exclusion plus efficaces pour les Na^+ . Ainsi, pour la racine, l'absorption des Na^+ serait diminuée par rapport aux Cl^- qui, via le flux transpiratoire, se retrouveraient en plus grande quantité dans les feuilles.

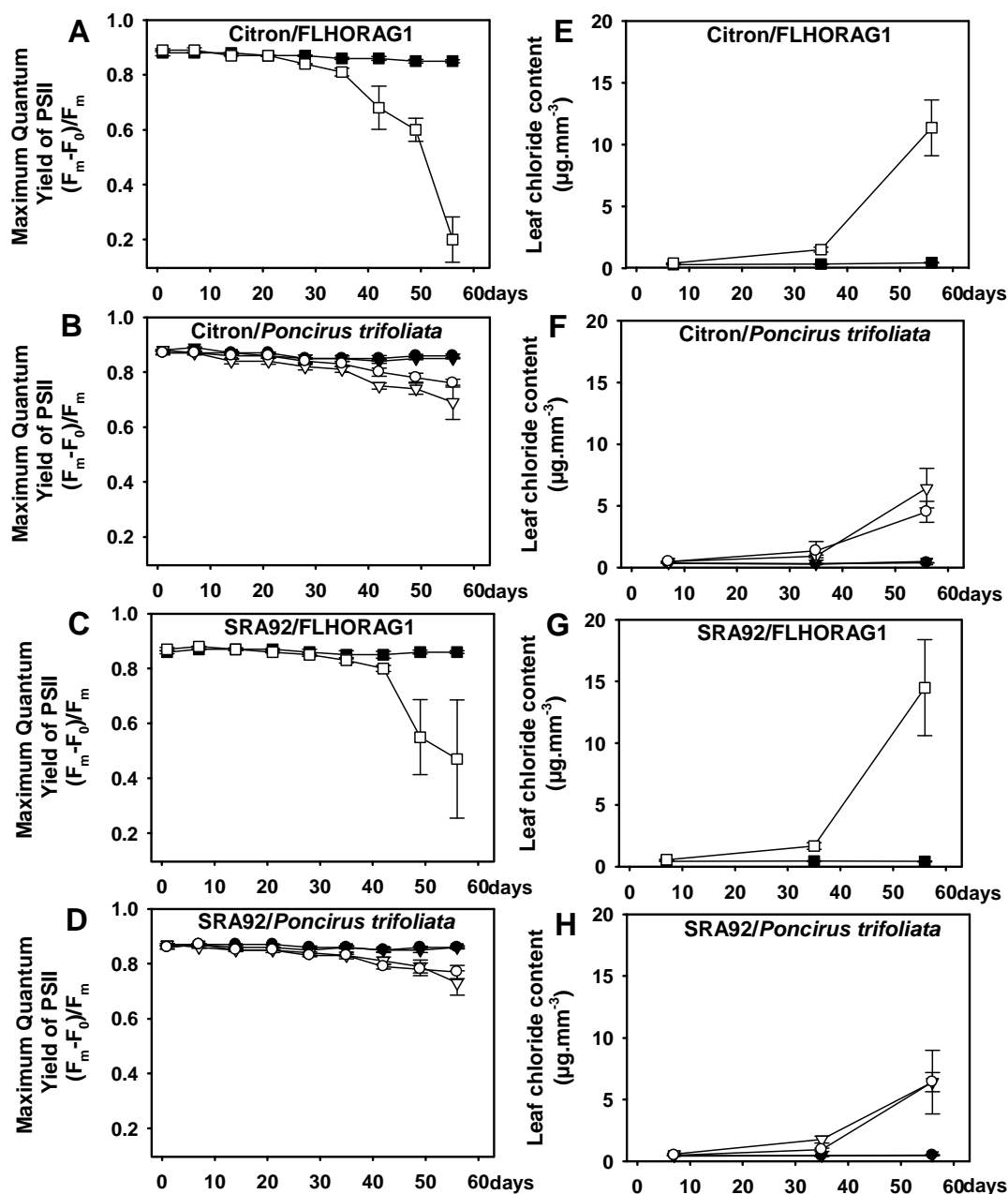


Figure 14 : Colonne de gauche: évolution de la fluorescence chlorophyllienne au cours du stress, soit $(F_m - F_0)/F_m$ (A: cédratier/FLHORAG1, B: cédratier/*Poncirus trifoliata*, C: clémentinier SRA92/FLHORAG1 et D: clémentinier SRA92/*Poncirus trifoliata*). Colonne de droite: évolution de la concentration foliaire en chlorure exprimée en $\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-3}$ au cours du stress. (E: cédratier/FLHORAG1, F: cédratier/*Poncirus trifoliata*, G: clémentinier SRA92/FLHORAG1 et H: clémentinier SRA92/*Poncirus trifoliata*). Les barres verticales représentent l'écart à la moyenne \pm SE. Légende : rond : cédratier/clémentinier SRA92 greffé sur Citrange carrizo/*Poncirus trifoliata* diploïde, triangle : cédratier/clémentinier SRA92 greffé sur Citrange carrizo/*Poncirus trifoliata* autotétraploïde, carré : cédratier/clémentinier SRA92 greffé sur FLHORAG1, symbole ouvert : stress, symbole fermé : témoin

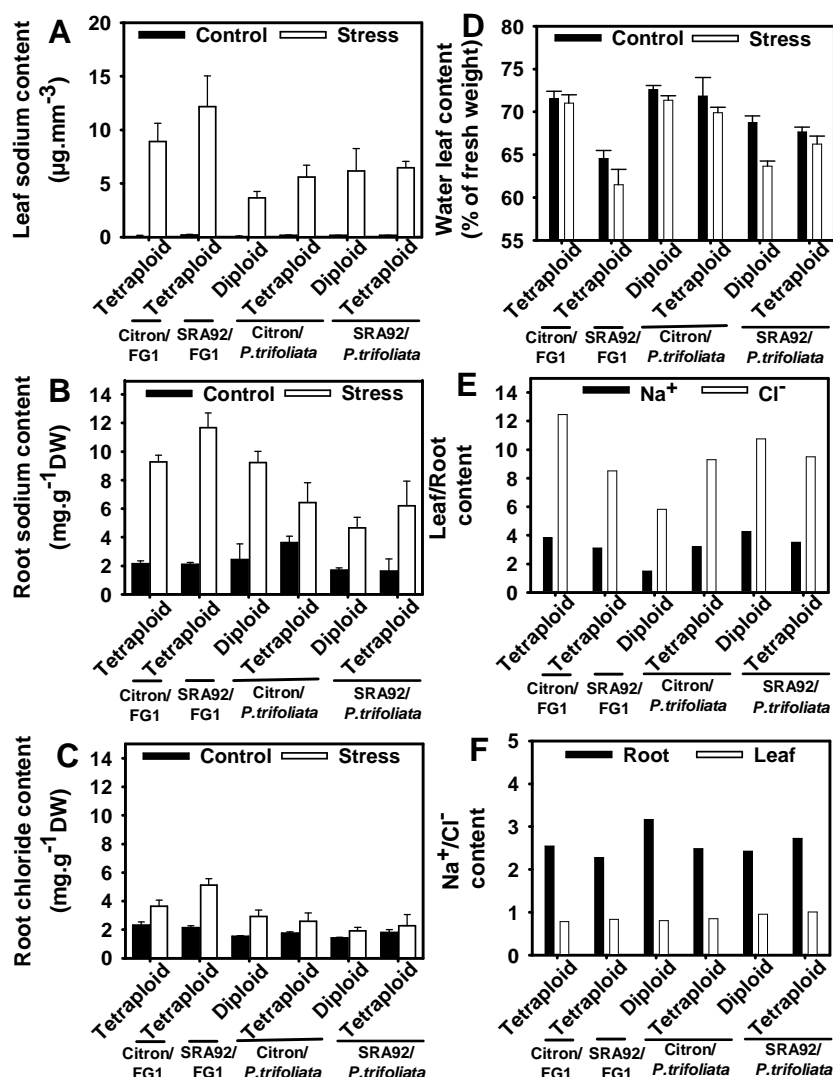


Figure 15 : A) Mesure de la concentration foliaire en sodium exprimée en $\mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$, B) de la concentration racinaire en sodium et C) en chlorure exprimée en $\text{mg}.\text{g}^{-1}$ de poids sec, D) du niveau d'hydratation des feuilles, E et F) de la distribution entre feuille et racine des ions Na^+ et Cl^- pour chaque génotype au dernier jour de l'expérience. Les barres verticales représentent l'écart à la moyenne \pm SE.

4.3.2. Les porte-greffes Citrange carrizo autotétraploïdes et diploïdes greffés avec le clémentinier commun ou le cédratier Etrog

Comme pour le *Poncirus trifoliata*, le Citrange carrizo autotétraploïde a été évalué en comparaison avec son homologue diploïde aussi bien franc-de-pieds que greffés avec le cédratier, ou le clémentinier SRA92, dans les mêmes conditions expérimentales que celles exposées dans l'article 2 (cf Tableau 8). Le stress salin appliqué dans ces conditions a permis, comme pour l'évaluation des *Poncirus trifoliata*, de maintenir le potentiel hydrique du sol proche de la pression osmotique imposée par la solution saline. Comme observé chez le *Poncirus trifoliata* autotétraploïde, le greffage du cédratier ou du clémentinier SRA92 sur Citrange carrizo autotétraploïde n'a pas amélioré leur tolérance au stress salin par rapport au greffage de ces mêmes variétés sur Citrange carrizo diploïde. Les mesures du rendement quantique maximum du PSII n'ont montré que peu de différences entre plants greffés sur autotétraploïdes et diploïdes (cf Figures 16 A, B et C). Même si elles ne sont pas significativement différentes, les valeurs de fluorescence chlorophyllienne ou de l'évolution des concentrations foliaire en chlorure semblent montrer que les génotypes autotétraploïdes sont plus sensibles au stress salin (cf Figures 16 D, E et F). En effet, les plants greffés sur Citrange carrizo autotétraploïde ont accumulé une quantité de chlorures supérieure à celle mesurée chez les plants greffés sur Citrange carrizo diploïde. Cette différence, apparemment liée aux différences morphologiques évoquées précédemment (cf Art. 1 et 2), était significative entre le Citrange carrizo autotétraploïde franc-de-pied ($9,74 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$) et le Citrange carrizo diploïde ($5,42 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$). Si le contenu foliaire en sodium était sensiblement identique entre tous les génotypes (cf Figure 17 A), la quantité de sodiums et de chlorures mesurée dans la racine en fin d'expérience variait selon la variété greffée, attestant de la relation complexe entre le greffon et son porte-greffe (cf Figures 17 B et D). Comme chez les *Poncirus trifoliata*, la quantité de sodiums accumulée par la racine était supérieure à celle des chlorures pour tous les génotypes. Les seules différences d'accumulation racinaire observées entre autotétraploïdes et diploïdes concernaient les Citrange carrizo greffés avec le cédratier. Les concentrations mesurées ont été respectivement estimées à $6,58 \text{ mg}.\text{g}^{-1}$ de poids sec (PS) et à $10,40 \text{ mg}.\text{g}^{-1}$ PS pour la racine des porte-greffes diploïdes et autotétraploïdes concernant les chlorures et à $13,09 \text{ mg}.\text{g}^{-1}$ PS et $19,06 \text{ mg}.\text{g}^{-1}$ PS pour la racine des porte-greffes diploïdes et autotétraploïdes concernant les sodiums (cf Figures 17 B et D). L'accumulation des chlorures était très faible chez les Citrange carrizo greffés avec le clémentinier SRA92, soit $1,85 \text{ mg}.\text{g}^{-1}$ PS dans la racine des porte-greffes diploïdes et $2,56 \text{ mg}.\text{g}^{-1}$ PS dans la racine des porte-greffes autotétraploïdes, alors que celle des sodiums était moins limitée, soit $5,54 \text{ mg}.\text{g}^{-1}$

PS dans la racine des porte-greffes diploïdes et $6,36 \text{ mg.g}^{-1}$ PS dans la racine des porte-greffes autotétraploïdes (*cf* Figures 17 B et D). Ces mesures, également effectuées au niveau de la racine des Citrange carrizo francs de pieds, n'ont pas permis de révéler de différences entre diploïdes et autotétraploïdes. Les concentrations en ions mesurées au niveau des racines semblent d'avantage dépendre de la relation greffon/porte-greffe que du niveau de ploïdie des porte-greffes. Une variété qui maintiendrait un flux de transpiration important consommerait une grande quantité d'eau, ce qui pourrait accélérer l'absorption des ions au niveau de la racine du porte-greffe. Ceci expliquerait les fortes concentrations en ions mesurées dans la racine des plants greffés avec le cédratier et serait un trait aggravant la sensibilité du cédratier vis-à-vis du stress salin. De même que pour les *Poncirus trifoliata*, le statut hydrique des feuilles a été maintenu constant tout au long de l'expérience chez tous les génotypes, à l'exception du cédratier greffé sur Citrange carrizo autotétraploïde (15% de perte par rapport au témoin) qui est aussi celui ayant accumulé le plus d'ions au niveau de ses racines (*cf* Figure 17 C). Par conséquent, la tolérance du cédratier, variété sensible au stress salin, n'a pas été améliorée par son greffage sur le Citrange carrizo autotétraploïde dans nos conditions de stress (abaissement du potentiel hydrique du substrat compensé par un apport d'eau quotidien). Cependant, la tolérance du cédratier greffé sur Citrange carrizo autotétraploïde serait-elle modifiée lors d'un choc salin (*i.e.* avec un abaissement important du potentiel hydrique du substrat entre deux arrosages dus à la présence d'une grande quantité de sels dans le sol)? Afin de pouvoir répondre à cette question, une seconde expérience de stress salin a été réalisée sur Citrange carrizo autotétraploïde et diploïde greffé avec le cédratier diploïde (*cf* Tableau 9). Cette dernière expérience avait pour but d'étudier le comportement du Citrange carrizo autotétraploïde et diploïde comme porte-greffe face à un choc salin engendré par l'application, à une fréquence de deux fois par semaine, d'une solution contenant 500 mM de NaCl à la capacité au champ. Malgré la différence de modalités expérimentales entre la 1^{ère} expérience (limitation de l'abaissement du potentiel hydrique grâce à un arrosage fréquent avec la solution saline) et la 2^e expérience (choc salin entraînant un important abaissement du potentiel hydrique du substrat et générant un manque d'eau entre deux arrosages), les résultats obtenus semblent similaires. Comme lors de la première expérience, les valeurs de rendement quantique du PSII mesurées étaient très similaires entre le cédratier greffé sur Citrange carrizo diploïde et le cédratier greffé sur Citrange carrizo autotétraploïde. Néanmoins, les valeurs de rendement quantique du PSII mesurées chez le cédratier greffé sur Citrange carrizo diploïde étaient de 0,61 alors que celles mesurées chez le cédratier greffé sur Citrange carrizo autotétraploïde étaient de 0,55, suggérant que les plants greffés sur porte-greffe

autotétraploïde étaient plus affectés par le stress (*cf* Figure 18 A). Ces valeurs sont à corrélérer à celles du taux de chlorophylle mesuré chez le cédratier greffés sur Citrange carrizo diploïde et autotétraploïde sous l'effet du stress salin (*cf* Figure 18 D). En effet, la dégradation des chlorophylles survient après que le rendement quantique du PSII soit affecté. En fin d'expérience, le taux de chlorophylle était de 67,42% chez le cédratier greffé sur diploïde (soit une baisse de 6,34% par rapport au témoin) et de 63,49% chez le cédratier greffé sur autotétraploïde (soit une baisse de 9,81% par rapport au témoin), montrant une tendance similaire à celle observée avec les mesures de rendement quantique du PSII. La fermeture stomatique, qui précède la chute du rendement quantique du PSII et une baisse de l'activité photosynthétique, s'est opérée simultanément entre plants greffés sur diploïdes et autotétraploïdes (*cf* Figure 18 B). En accord avec cette observation, aucune variation de poids entre plants greffés sur autotétraploïdes et plants greffés sur diploïdes a été reporté entre deux arrosages (*cf* Figure 18 C). Néanmoins, un délais de 24 heures est notable entre les premières chutes de feuilles observées le 10^e jours pour les cédratiers greffés sur Citrange carrizo diploïde et le 11^e jour pour les cédratiers greffés sur Citrange carrizo autotétraploïdes (*cf* Figure 18 E). Aucune différence de concentration foliaire en chlorures ou de potentiel hydrique foliaire n'a été observée entre les différents génotypes stressés (*cf* Figure 19). Ceci suggère que le choc osmotique, engendré par l'application de 500 mM de NaCl deux fois par semaine, n'a pas modifié le comportement du cédratier greffé sur Citrange carrizo autotétraploïde par rapport à la 1^{ère} expérience. Malgré les deux modalités d'application du stress, les résultats obtenus sont similaires d'une expérience à l'autre. Ces résultats obtenus en serre sur des plants greffés ne corroborent pas ceux obtenus sur plants franc-de-pieds en chambre de culture par Salhe *et al.*, (2008) et Mouhaya *et al.*, (2009). La complexité des interactions intervenant entre le greffon et son porte-greffe, associé au fait que les expériences furent effectuées en conditions semi-contrôlées en serre, peut expliquer ces différences. Cependant, l'effet de l'abaissement du potentiel hydrique survenant entre deux arrosages au niveau du substrat semble être négligeable comparé au stress engendré par l'absorption des ions chlorures et sodiums. L'étude du cédratier greffé sur Citrange carrizo diploïde et autotétraploïde n'a pas permis d'affirmer que l'utilisation d'un porte-greffe autotétraploïde permettait d'améliorer la tolérance au stress salin dans ces conditions. Toutefois, une remarque intéressante peut être faite en observant la progression de la conductance stomatique entre les cédratiers greffés sur Citrange carrizo diploïdes et les cédratiers greffés sur Citrange carrizo autotétraploïdes en condition témoin (*cf* Figure 18 B). En effet, la conductance stomatique des cédratiers greffés sur diploïdes était supérieure à celle mesurée chez les

cédratiers greffés sur autotétraploïdes. Cette différence de conductance stomatique, qui traduit la perte de vapeur d'eau induite par la transpiration, pourrait se révéler être un atout majeur lors d'une période de sécheresse : une faible conductance stomatique du greffon permettrait de limiter sa consommation d'eau et de préserver les réserves du substrat. Le greffon ne paraissant pas être affecté par cette limitation, le greffage sur porte-greffe autotétraploïde serait un moyen de réduire ses besoins en eau, de diminuer les fréquences d'arrosage et d'économiser des ressources en eau toujours plus rares.

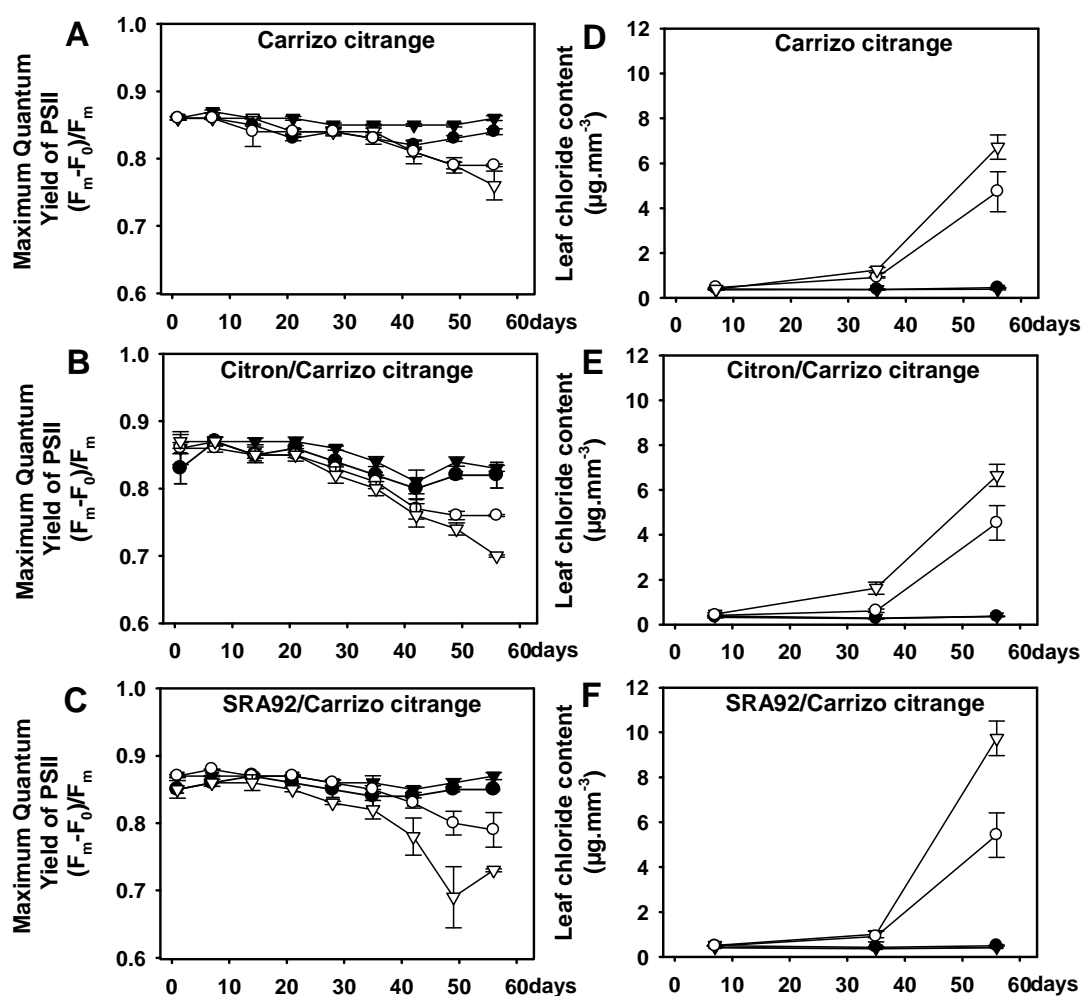


Figure 16 : Colonne de gauche: évolution de la fluorescence chlorophyllienne au cours du stress, soit $(F_m - F_0)/F_m$ (A: Citrange carrizo, B: cédratier/Citrangle carrizo et C: clémentinier SRA92/Citrangle carrizo). Colonne de droite: évolution de la concentration foliaire en chlorure exprimée en $\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-3}$ au cours du stress. (D: Citrange carrizo, E: cédratier/Citrangle carrizo, et F: clémentinier SRA92/Citrangle carrizo). Les barres verticales représentent l'écart à la moyenne \pm SE. Légende : rond : cédratier greffé sur Citrange carrizo diploïde, triangle : cédratier greffé sur Citrange carrizo autotétraploïde, symbole ouvert : stress, symbole fermé : témoin

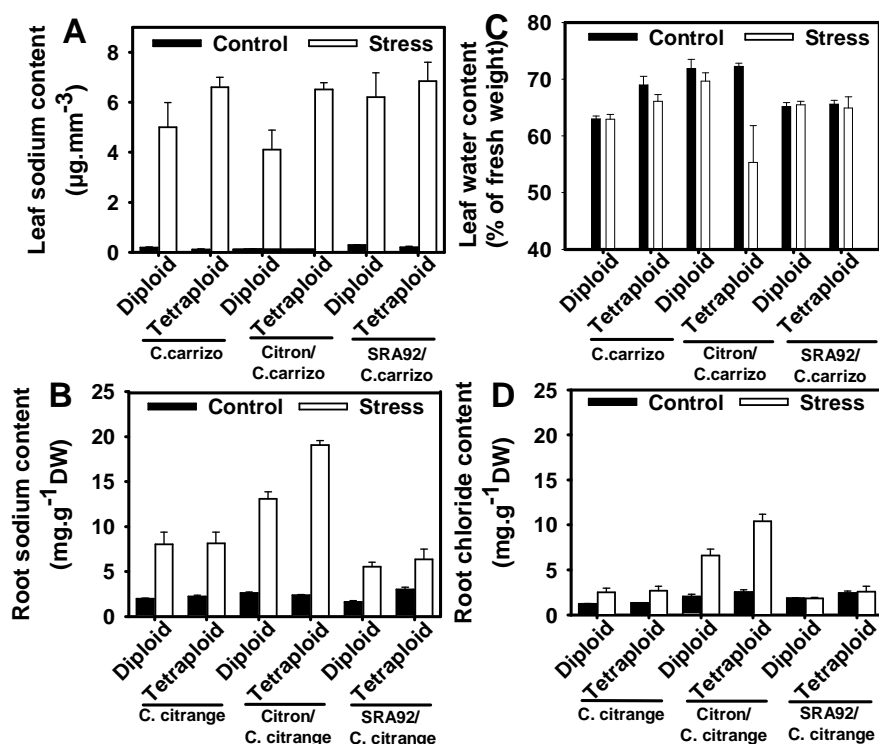


Figure 17 : A) Mesure de la concentration foliaire en sodium exprimée en $\mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$, B) de la concentration racinaire en sodium et D) en chlorure exprimée en $\text{mg}.\text{g}^{-1}$ de poids sec et C) du niveau d'hydratation des feuilles pour chaque génotype au dernier jour de l'expérience. Les barres verticales représentent l'écart à la moyenne \pm SE.

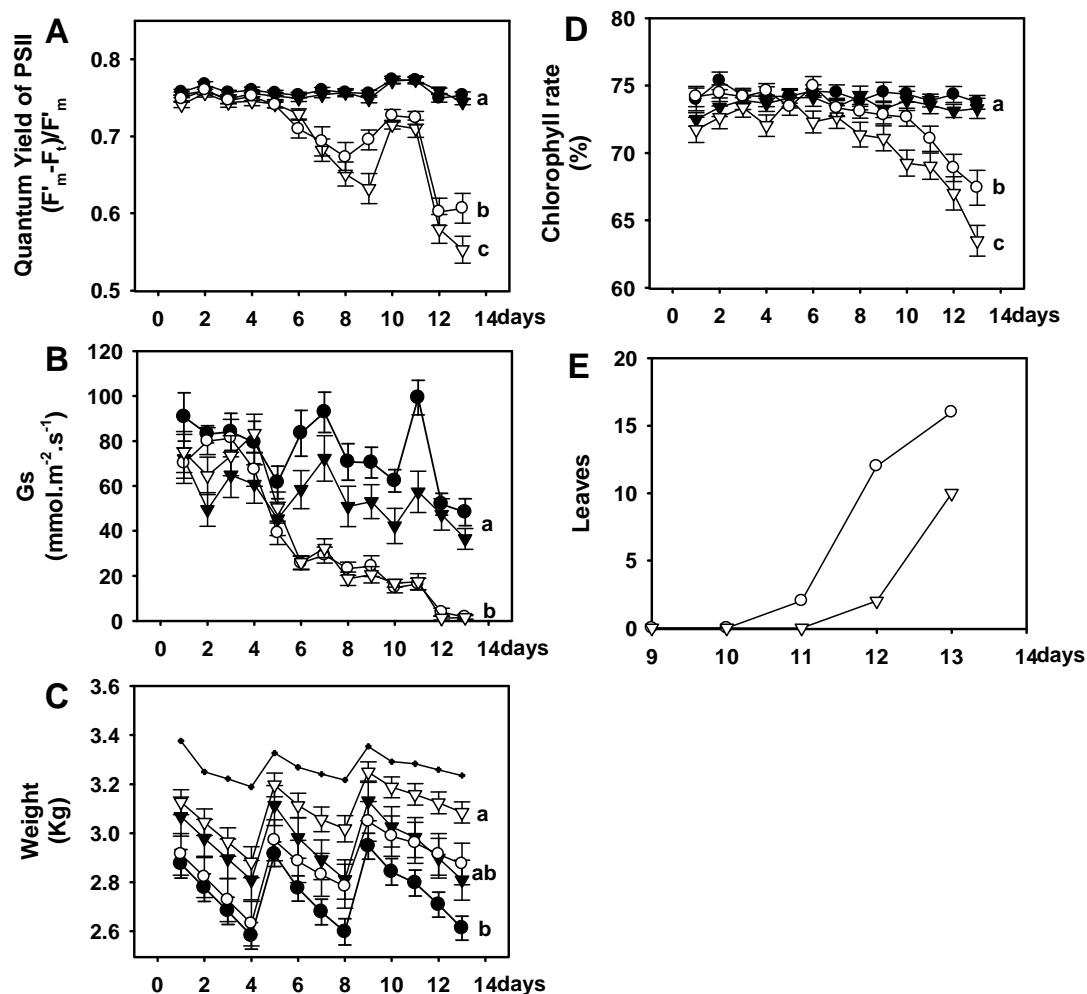


Figure 18 : A) Mesure du champ quantique du PSII ($(F'_m - F_t)/F'_m$), B) de la conductance stomatique (Gs en $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), C) de la perte hydrique (Kg), D) du taux de chlorophylle (%) et E) de la chute foliaire du cédratier greffé sur Citrange carrizo diploïde et autotétraploïde au cours du stress salin (500 mM, 2x/semaine). Les lettres indiquent une différence significative ($P < 0.05$) et les barres verticales représentent l'écart à la moyenne \pm SE. Légende : rond : cédratier greffé sur Citrange carrizo diploïde, triangle : cédratier greffé sur Citrange carrizo autotétraploïde, symbole ouvert : stress, symbole fermé : témoin

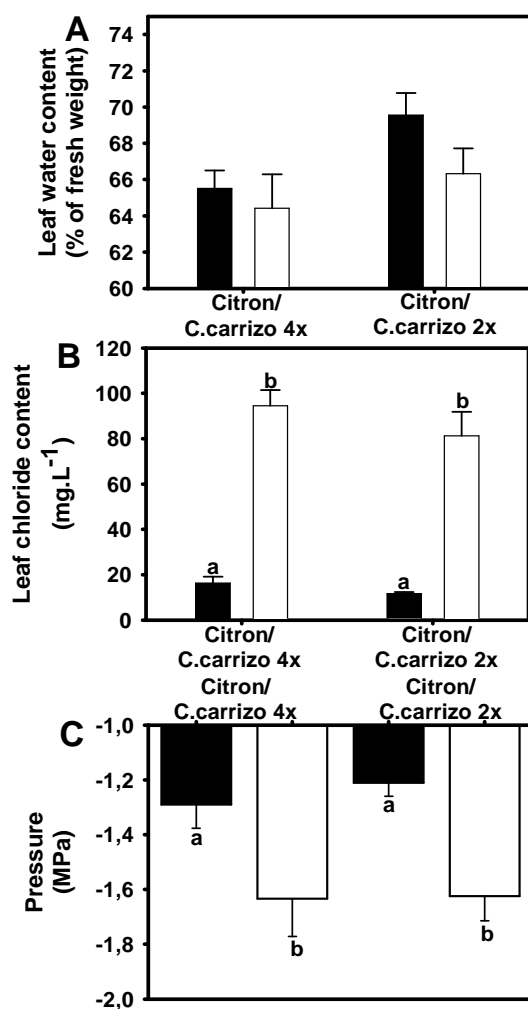


Figure 19 : A) Mesure du statut hydrique des feuilles, B) de la concentration foliaire en chlorure en mg.L⁻¹ et C) du potentiel hydrique foliaire en MPa au dernier jour de l'expérience (stress salin de 500 mM, 2x/semaine) entre plants témoins (noir) et stressés (blanc) greffés sur Citrange carrizo diploïde et autotétraploïde. Les lettres représentent une différence significative ($P < 0.05$) et les barres verticales représentent l'écart à la moyenne \pm SE.

4.4. ARTICLE 3 : LES DIFFERENCES MORPHOLOGIQUES ET ANATOMIQUES OBSERVEES ENTRE LA LIME RANGPUR (*CITRUS LIMONIA*) DIPLOIDE ET AUTOTETRAPLOIDE SONT ASSOCIEES Á DE FAIBLES MODIFICATIONS D'EXPRESSION GENIQUE AU NIVEAU DES FEUILLES

INTRODUCTION : Les polyploïdes représentent environ 70% des angiospermes et sont largement présents dans le règne végétal. Ce succès est le résultat d'une remarquable capacité d'adaptation de la part des polyploïdes au cours de l'évolution. Les polyploïdes peuvent être allopolyploïdes ou autopolyploïdes selon qu'ils sont issus, respectivement, d'une hybridation interspécifique de gamètes non réduite ou d'un doublement du matériel génétique somatique (apomixie partielle ou autofécondation). Les modifications épigénétiques et génétiques engendrées par l'hybridation de génomes à multiples copies entraîne un accroissement de l'hétérozygotie chez les allopolyploïdes. Ces modifications sont également à l'origine de phénomènes facilitant l'adaptation à des changements brusques de l'environnement comme la subfonctionnalisation. Cependant, les modifications du transcriptome observées chez les allotétraploïdes paraissent être d'avantage le résultat de l'hybridation que de la polyploïdisation. Chez les plants autopolyploïdes, une récente étude a mis en évidence que peu de changements de l'expression des génomes avaient lieu suite à l'évènement de polyploïdisation. Les changements morphologiques observés suivant le niveau de ploïdie seraient principalement dus à l'effet du dosage nucléaire et des modifications cellulaires engendrées par la polyploïdie. La lime Rangpur (*Citrus limonia*, Osbeck), résultat du croisement du cédratier (*Citrus medica*) et du mandarinier (*Citrus reticulata*), est tolérant au déficit hydrique et est principalement utilisé comme porte-greffe au Brésil. Les agrumes sont capables de reproduction végétative grâce à la polyembryonie et à l'apomixie partielle. Cependant, 1 à 7% des semences générées sont autotétraploïdes suite à un doublement du matériel chromosomique du tissu nucellaire. De nombreux traits anatomiques différencient les autotétraploïdes de leurs diploïdes respectifs (épaisseur foliaire, taille stomatique, transpiration, etc.). Une étude du transcriptome, associée à une analyse des différences morphologiques et anatomiques entre autotétraploïdes (4X) et diploïdes (2X), a été réalisée afin de définir les liens entre anatomie, transcriptome et ploïdie chez la lime Rangpur (LR).

MATERIELS ET METHODES : La croissance et la conductance stomatique (g_s) de 15 plants de LR2X et de LR4X âgés de 6 mois ont été mesurées en serre durant 40 jours. Des mesures de perte hydrique, d'épaisseur foliaire, de taux de chlorophylle, de taille et de densité stomatique ont été réalisées entre les feuilles de LR2X et de LR4X. Parallèlement, des observations au

microscope de coupe histologique réalisée à partir de feuille, de pétiole, d'entre-nœud et de racine ont été réalisées chez la LR2X et la LR4X. Enfin, à partir d'échantillons foliaires, une étude du transcriptome entre la LR2X et la LR4X a été effectuée sur puces à ADN, puis confirmée par RT-PCR en temps réel.

RESULTATS ET DISCUSSION : L'évènement de polyploïdisation s'accompagne de bouleversements morphologiques qui sont identifiés chez la LR4X lorsqu'ils sont comparés à ceux de la LR2X (*gs*, taille cellulaire, épaisseur foliaire, taux de chlorophylle). Ces différences phénotypiques représentent un atout adaptatif pour les LR4X. La taille stomatique, la taille des cellules (cellules du cortex, du mésophylle) et de l'épaisseur foliaire étaient plus importantes chez la LR4X, alors que la densité stomatique et la transpiration y étaient plus faibles. Ces phénomènes ont une incidence sur l'assimilation du CO₂, la transpiration et la croissance qui sont réduites chez la LR4X. Le fait que les cellules 4X soient plus grosses et que le contenu en eau des feuilles de LR4X soit plus important que chez les feuilles 2X pourrait être un avantage lors d'un déficit hydrique. En forte humidité, la croissance des plants 4X devient plus importante que celle des plants 2X. En effet, lorsque les stomates sont fermés, la circulation de l'eau se fait préférentiellement par la voie trans-cellulaire dont les échanges peuvent être accrus avec l'augmentation de la taille cellulaire observée chez la LR4X. De même, la couche cuticulaire, comme les tissus du cortex, est naturellement plus épaisse chez la LR4X que se soit à la feuille, à l'entre-nœud ou à la racine. La LR4X semble, par conséquent, moins sensible à la dessiccation et aux blessures mécaniques que peut l'être la LR2X. L'analyse du transcriptome, réalisée à partir d'échantillons foliaires et au moyen de puces à ADN (21081 gènes), a montré une différence d'expression génique inférieure à 1% entre la LR2X et la LR4X. L'étude par RT-PCR en temps réel de l'expression des gènes *CCR*, *PC*, *lhca2*, *Px63*, *HIF* et *Cdc2K* surexprimés chez la LR4X a permis de confirmer les résultats obtenus au moyen des puces à ADN. Ces gènes, qui sont surexprimés chez la LR4X, sont principalement impliqués dans la constitution des parois (*CCR*), dans la synthèse de molécules nécessaire à la photosynthèse (*PC*, *lhca2*), dans la détoxification cellulaire (*Px63*), dans les régulations épigénétiques (*HIF*) et dans les cycles de division cellulaire (*Cdc2K*). Ces gènes sont donc ceux impliqués dans l'établissement du phénotype 4X : accroissement de l'épaisseur des organes (*CCR*), du taux de chlorophylle (*PC*, *lhca2*), de la tolérance aux stress (*Px63*), de la régulation épigénétique et de la croissance (*HIF*, *Cdc2K*). Les faibles différences d'expression génique entre les 2 génotypes suggèrent que le phénotype 4X serait lié à un effet de dosage nucléaire. Il serait intéressant d'évaluer la LR4X en condition de stress afin de vérifier son potentiel en tant que porte-greffe.

ARTICLE N°3

LARGE MORPHOLOGICAL AND ANATOMICAL DIFFERENTIATION BETWEEN DIPLOID AND AUTOTETRAPLOID RANGPUR LIME (*CITRUS LIMONIA*) ARE ASSOCIATED WITH LIMITED CHANGES IN LEAF GENE EXPRESSION

T. Allario, J. Brumos, J.M. Colmenero-Flores, F. Tadeo, M. Talon, L. Navarro, P. Ollitrault, R. Morillon

LARGE MORPHOLOGICAL AND ANATOMICAL DIFFERENCES BETWEEN DIPLOID AND AUTOTETRAPLOID RANGPUR LIME (*CITRUS LIMONIA*) ARE ASSOCIATED WITH LIMITED CHANGES IN LEAF GENE EXPRESSION

Thierry Allario^{1,2}, Javier Brumos², Jose Manuel Colmenero-Flores^{2,4}, Francisco Tadeo²,
Manuel Talon², Luis Navarro³, Patrick Ollitrault^{1,3} and Raphaël Morillon^{1,2}

¹Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

²Centro de Genomica. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

³Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

⁴Current address: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Av Reina Mercedes 10, 41012-Sevilla, Spain.

Article soumis pour publication à *Planta*

ABSTRACT

In autotetraploid plants very little is known about the molecular origin leading to their large phenotypical differentiation. We characterized the morphology and anatomy of diploid (2X) and autotetraploid (4X) Rangpur lime (*Citrus limonia*) seedlings. 2X were more vigorous in comparison with 4X although, leaves stem and roots of these plants were thicker and contained larger cells. Water status was also deeply modified in 4X genotypes since in these plants leaf water content was much greater. We then analyzed the leaf transcriptome expression using a citrus microarray containing 21081 genes. The number of genes differentially expressed in both genotypes was less than 1 % and the maximum rate of gene expression change was within a twofold range. Six up-regulated genes in 4X allowed us to validate through qRT-PCR microarray results. Five of these genes were apparently implicated in the response to water deficit suggesting that citrus autotetraploids may partially perform as diploid citrus plants under water shortage. The sixth up-regulated gene that coded for a histone may also have an important role regulating transcription of growth processes. These results suggest that in citrus autotetraploids, large phenotypical differentiation correlates with subtle changes in gene expression rather than with extensive transcription re-organization.

KEYWORDS : autotetraploid, citrus, gene expression

INTRODUCTION

Polyploidization events are frequent in the plant kingdom with an estimation of 70 % of polyploids in angiosperms (Masterson 1994). Polyploids were selected because selective advantages over 2X can usually be observed such as an enhanced vigor. Polyploids may be allopolyploids or autopolyploids and may result either from sexual reproduction via 2n gametes or somatic chromosome doubling. It means that allopolyploids inherited subgenomes coming from two different parents after interspecific hybridization. Autopolyploids arise from somatic chromosome doubling, such as most 4X citrus genotypes, and from intraspecific hybridization or self-fertilization through 2n gametes. Subgenomes of autopolyploids are then considered as being identical.

Numerous studies dealing with genetic and epigenetic changes associated with polyploidization were performed on newly created allopolyploid materials (eg: Song *et al.* 1995; Comai *et al.* 2000; Kashkush *et al.* 2003; Wang *et al.* 2006; Lukens *et al.* 2006). Recently Ni *et al.* (2009) proposed that hybrids and allopolyploids gain advantages from the control of circadian-mediated physiological and metabolic pathways, leading to growth vigor and an increased biomass.

According to Adams *et al.* (2003), those changes in gene expression are potentially advantageous in allopolyploids because an increase of heterozygosity may be at the origin of subfunctionalization. After duplication, two gene copies become specialized to perform complementary functions (Ward and Durrett 2004); hence, a partitioning of functions and/or expression patterns between duplicated genes occurs leading to the preservation of both loci, which can also turn out to be regulated in a tissue-specific manner. This may favor the adaptation to environmental changes. As well, expression of homeologous genes in allopolyploids may be regulated by diverged regulatory elements associated with different subgenomes (Stupar *et al.* 2007).

To date, genome expression changes in allotetraploids is considered to be more affected by genome hybridization than by genome ploidy changes (Auger *et al.* 2005). Studies aimed to identify changes in the genome expression pattern of autotetraploids are less numerous (eg: Guo *et al.* 1996; Albertin *et al.* 2005; Stupar *et al.* 2007). On the contrary for allotetraploids, the alteration of the expression of any allele in autopolyploids may result to phenotype changes since no potential for homologous complementation or advantageous subfunctionalization would occur. Quite recently, Stupar *et al.* (2007) investigated autopolyploid series in potato including one monoploid clone, 2X clones, and one 4X clone. Analysis of the transcriptome using microarrays showed that gene expression changes was

very limited, suggesting that autopolyploids derive all of their alleles from a single specie and may experience fewer alterations in their regulatory networks, resulting in fewer gene expression changes (Stupar *et al.* 2007). According to these authors, gene expression changes observed in between 2X and 4X genotypes could be more likely attributed to nuclear dosage and ploidy-driven cellular modifications that may affect cell size, division rate, or organellar composition.

Citrus scion varieties are grown on rootstocks to overcome biotic and abiotic problems (Levy and Syvertsen 2004; Tadeo *et al.* 2008). Rangpur lime (*Citrus limonia*, Osbeck), is according to Nicolosi *et al.* (2000), a hybrid between citron (*Citrus medica*) and mandarin (*Citrus reticulata*), probably back-crossed with the mandarin gene-pool. This fast-growing tree is more cold-tolerant than the lime and is considered as a water deficit tolerant rootstock. This rootstock, which is unfortunately highly sensitive to phytophthora root rot (Carpenter and Furr 1962; Viana *et al.* 2004), is the most widely used rootstock in Brazil, the first citrus producer in the world. Citrus rootstocks are propagated by polyembryonic seeds since citrus are partially apomictic. Spontaneous 4X plants arise in seedlings with a frequency varying from 1 to 7% (Barrett and Hutchinson 1982; Saleh *et al.* 2008). These 4X occur from chromosome stock doubling of nucellar cells (maternal tissue) (Cameron and Soost 1969). Leaves of 4X citrus are thicker and their mesophyll cells have larger volume (Romero-Aranda *et al.* 1997). Autotetraploid Citrus seedlings were shown to have lower growth rates than their respective 2X parentals, associated with lower rates of whole plant transpiration (Syvertsen *et al.* 2000). In citrus, newly spontaneous 4X plants that arise among seedlings from the seeds of 2X mother trees are nucelar. As well, almost all the seedlings that arise from the seeds of 4X mother trees are autotetraploid (Schwartz *et al.* 2001). Consequently, citrus represents a very interesting material to compare the transcriptomes of 4X *versus* 2X genotypes immediately after the autopoloidization event. In this study, we investigated the plant growth, the anatomy and the genome expression patterns of 2X and 4X Rangpur lime seedlings in order to identify genes exhibiting ploidy-dependent expression that may be at the origin of the phenotypical differentiation of autotetraploids.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Diploid (2X) seeds of Rangpur lime (*Citrus limonia*, Osbeck ; IVIA 334) were provided by the IVIA germplasm collection, Spain. At IVIA, a few years ago, an autotetraploid (4X) Rangpur lime tree (IVIA 516) was selected among a population of seedlings from a diploid (2X) original tree (IVIA 334). Autotetraploid (4X) seeds of Rangpur lime, were provided by this tree. Seeds were planted in substrate composed of a mixture of sand, turf and peat, 1:1:1, in a greenhouse for 4 months. The ploidy status of 2X and 4X plants was checked by flow cytometry (Partec I).

Plant growth rate, leaf stomatal conductance and relative water content

A total of 15 uniform 2X and 4X plantlets were selected and transplanted on the same commercial soil medium. Potted seedlings were grown in the greenhouse under natural photoperiod conditions, with maximum/minimum air temperatures of 18/16 and 29/24 °C at night and day, respectively, and relative humidity between 40 and 85 %. Plants were irrigated with standard nutrient solution composed of 3 mol m⁻³ Ca(NO₃)₂, 3 mol m⁻³ KNO₃, 2 mol m⁻³ MgSO₄, 2.3 mol m⁻³ H₃PO₄, 17.9 mmol m⁻³ Fe-ethylenediamine dihydroxyphenyl acetic acid and trace elements.

Plant growth, leaf water content and leaf morphology

Six month-old plants were monitored to determine growth rate, height and leaf water parameters during 40 days. On the same period, the leaf stomatal conductance was monitored by using a leaf porometer (SC-1, Decagon Device) for 20 days. As well, the relative leaf water loss of 2X and 4X was calculated by measuring the weight of fresh leaves and the weight of leaves along 100 hours of desiccation at 25°C. For that goal, 10 excised leaves per genotype were regularly weighted until to attend the leaf dry mass.

Leaf thickness and area of 10 leaves of each genotype were measured respectively by scanning the leaves and using a micrometer (Mitutoyo, IP65, Japan). Total leaf greenness was measured using a SPAD meter (Minolta, SPAD-502, Japan). Slides for analysis of stomatal size and density were prepared according to Morillon and Chrispeels (2001a).

Leaf, stem and root anatomy

Samples of leaves, petiole and internodes from representative 2X and 4X Rangpur lime plants were taken at the level of the third and fourth internode (top to bottom). Distal fine root portions were collected as well. Samples were fixed and embedded in Micro-Bed resin (Electron Microscopy Sciences, Forth Washington, Pa., USA) according to Tadeo *et al.* (1995). Sections (about 1 mm thick) were cut with a Leica RM2255 microtome (Leica

Microsystems, Wetzlar, Germany) using glass knives and fixed to microscope slides. Cross-sections of leaf blades and cross-sections of internodes were stained with 0.05% Toluidine Blue O (CI 52040; Merck, Darmstadt, Germany) and examined and photographed with a Leica DM LA microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The morphometrical analysis was performed on highly contrasted micrographs with the Leica IM software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

RNA extraction and labeling

In order to investigate differences between the transcriptomes of the 4X and the 2X genotypes (plant material described before), total RNA was purified from leaves. Four independent biological replicates were harvested at the same time (from 6 to 8 pm) of the day to prevent interfering effects of circadian rhythms. Samples were stored at minus 80°C and total RNA purification and quality assessment were performed as previously described (Brumós *et al.* 2009).

Microarrays hybridization

In this work, we used the Citrus genome-wide cDNA microarray that includes 21,081 putative unigenes (Martinez-Godoy *et al.* 2008). This microarray has proven to be very useful and efficient for comparison of the several *Citrus* species since they are genetically very close (Barrett and Rhodes 1976) and therefore *Citrus* ortholog genes have high level of identity (Terol *et al.* 2007; Martinez-Godoy *et al.* 2008). Furthermore, the microarray was constructed from many libraries obtained from several species, and the origin of the different ESTs was not taken into account during contig assembly and analysis (Martinez-Godoy *et al.* 2008). Total RNA (25 µg) was labelled as previously described (Forment *et al.* 2005). To avoid dye-related artefacts, 2X and 4X samples were dye-swapped and used to hybridize four slides. Microarray hybridization and washings were performed as previously described (Forment *et al.* 2005).

Data analysis

A GenePix 4000B microarray scanner (Axon Instruments, Inc.) and the GenePix Pro 4.1 acquisition software were used to scan the chips according to previously described parameters (Forment *et al.* 2005). Raw data was imported into the software R for preprocessing, visualization and statistical analysis. Expression ratio was computed as the ratio between the background-subtracted foreground intensities of the red and green channels. Only spots with background-subtracted foreground intensity greater than two in at least one channel were selected and used for normalization and further analysis. M-value was defined as the logarithm in base 2 of the expression ratio. After microarray hybridization, signal intensity,

uniformity of the expression ratio over the chip surface, and normality of M-value distributions were evaluated. Only microarrays with optimal hybridization data were pre-processed and normalized for further analyses while those that did not reach the minimum quality values were discarded. Reproducibility between replicates that was further assessed indicated that the experimental system provided consistent signals in spots corresponding to the same gene and acceptable variability between biological replicates (not shown). The Linear Models in Microarrays (LIMMA; Smyth 2005) software package was used for data normalization (Smyth and Speed 2003) and for the identification of probes showing significant differential gene expression between samples (Smyth 2004). Differences in gene expression were considered to be significant when the *P*-value was smaller than 0.05 and the $M\text{-value} \geq |0.5|$.

Functional analysis

Gene ontology (GO; Ashburner *et al.* 2000) term annotation of array features and function-based analysis of microarray results were carried out with Blast2GO (Conesa *et al.* 2005). GO terms for each of the three GO main categories (biological process, molecular function and cellular component) were obtained from sequence similarity using the application default annotation parameters. GO annotations were completed by locally running homology searches specifically against the Tair Arabidopsis database, appending InterProScan functional results to GO annotation (Quevillon *et al.* 2005) and applying the Second Layer Gene Ontology augmentation strategy (Myhre *et al.* 2006), all three functionalities available within the Blast2GO software. GO term enrichment analysis of significant differentially expressed genes was performed with the Fisher's Exact Test (Blüthgen *et al.* 2005) also present in the application.

Real-time reverse transcription-PCR

A set of 6 genes observed to be up regulated from microarrays analyzing was selected for RT-qPCR experiment in order to validate results obtained from microarrays. Genes that were chosen for qRT-PCR were searched among all sequences in the non-redundant databases using the BLASTN and TBLASTX algorithms and in the citrus EST database (CFGP database, Citrus Functional Genomic project, <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/bioinfo.ibmcp.upv.es>). The primers that were used in real time RT-PCR (Table 4) were defined using the software Oligo Explorer (Gene Link™, <http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>) to select primer pairs with minimal number of potential primer dimers and primer hairpins as possible.

Quantitative real-time RT-PCR was performed with a LightCycler 2.0 Instrument (Roche) equipped with LightCycler Software version 4.0 according to the procedure previously reported (Colmenero-Flores *et al.* 2007).

Statistical analysis

Data are expressed by the mean value \pm SE. We used SIGMASTAT from SPSS (Chicago; www.spss.com_software_science) to analyze the data. The *t* test and ANOVA test were used to detect differences between the genotypes and the growing conditions at the usual probability level of $P < 0.05$.

RESULTS

Autotetraploid obtaining

Using flow cytometry, the ploidy status of Rangpur lime seedlings was verified. No 2X plant was found among seedlings obtained from seeds of the autotetraploid mother tree. However, one 4X plant was found among 45 seedlings obtained from seeds of the diploid mother tree. This autotetraploid was removed from the plot.

Stomata size and density of 2X and 4X genotypes

Autotetraploid Rangpur lime presented thicker and greener leaves than 2X but their leaf area was similar (Table 1). Leaf stomata size and density of 2X and 4X plants were investigated. 4X leaves presented a 60% increase in stomata size and a 70% decrease in stomata density when compared to 2X.

Plant growth rate, leaf stomata conductance and leaf relative water content

Five months-old 4X Rangpur lime plants were smaller than the 2X genotypes. No delay of germination was observed in between 2X and 4X seeds even if 4X seeds were shown to be much bigger than 2X (data not shown). Therefore, germination cannot be at the origin of the difference of growth rate. Plant growth and stomata conductance (g_s) of individual plants grown in greenhouse were monitored. Diploid plants presented a faster growth rate and higher stomata conductance than 4X (Fig.1 A, B).

Leaf water loss was investigated in 2X and 4X Rangpur lime plants by weighing detached leaves for 4 days after leaf excision. At the beginning, 4X leaves were clearly heavier than 2X. After one hour at 25C°, we may expect that the stomata of excised leaves were already closed. Indeed, along the next 6 hours, the slope of the leaf water loss did not change confirming this hypothesis. During the next 24 hours, 4X excised leaves presented a much faster water loss than diploid. After 4 days, 4X leaf dry weight was not significantly different of 2X (Fig.1 C).

Leaf, petiole, stem and root anatomy

The foliar limb was significantly thicker in 4X than in 2X plants because of the increase in size of palisade parenchyma cells, lacunar parenchyma and epidermal cells (Fig. 2F, Table 2). However, it is worthy to note that the percentage of the lacunar area was not significantly affected. Measurements of the leaf central nerve (diameter and area) and percentage of vessels area showed that 2X were bigger and presented a greater area of vessels than 4X (Fig. 2C and D, Table 2). For the petiole (diameter and surface), the xylem cell area, the percentage of vessels area was not significantly different. However, the cortex cell area and the medulla cell

area were significantly smaller in 2X when compared to 4X, mostly because the 2X cells were smaller (Fig. 2E and F, Table 2).

Investigations of stem slides revealed that whereas the length and width, as well as the total slide stem area were not significantly different between 2X and 4X, the cortex cell area, the xylem cell area, the epidermis cell area and the cuticle thickness were significantly bigger in 4X compared to 2X (Fig. 3). Also, although the medulla cell area and the percentage of vessel area appeared to be smaller for 2X compared to 4X, they were not significantly different (Fig. 2G and H, Table 2).

Last, we studied the root anatomy : root diameter, cortex cell area, and epidermal cell area were much greater in 4X compared to 2X. Only the xylem cell area and percentage of vessel area were not significantly different between 2X and 4X (Fig. 2I and J, Table 2).

Microarray experiments and gene expression analysis

Leaf samplings were harvested for microarray experiments in order to investigate the gene expression in between 2X and 4X Rangpur lime genotypes. After hybridization, only information from microarrays with optimal hybridization data were pre-processed and normalized for further analyses (see methods). Probes showing significant differential expression during the treatment were identified using the R-package Limma (Linear Models for Microarray Data) tool (Smyth 2005). It is interesting to note that the maximum rate of gene expression change (up or down regulated genes) was within a twofold range. 229 were found to be differentially expressed when comparing 4X vs 2X Rangpur lime seedlings. Provided the clear physiological and anatomical differences described before, this could be considered as a quite limited number of differentially expressed genes. 151 genes (107 annotated) were overexpressed in 4X with regard to 2X, while the remaining 78 genes (41 annotated) were overexpressed in 2X with regard to 4X. Functional classification of genes was performed using Blast2GO (B2G), a research tool designed to enable Gene Ontology (GO) based data mining (Conesa *et al.* 2005). However, after analysis of differentially expressed genes, we were not able to identify functional categories significantly enriched in any functional group through Fisher's exact tests with Multiple Testing Correction using the B2G software (data not shown). Therefore, relevant functional categories were identified as those showing strong annotation intensity. For this we used the Annotation Graph Score implemented in the Blast2GO application (Gotz *et al.* 2008), which combines the number of annotated genes to a given GO term and specificity (position in the GO DAG) of the term. Relevant functional categories were identified as those having a Annotation Graph Score higher or equal than 3 and an ontology hierarchical level greater than 4 (Table 3). For

the category “response to ABA stimulus”, 5 genes were specifically induced in the 4X genotype while none was overexpressed in the 2X genotype. In related categories like “response to stress” and “response to abiotic stimulus” (hierarchical level <4) a higher number of genes were also overexpressed in the 4X genotype. Other relevant categories were involved in processes related to transcription, translation and post-translational protein modification. These categories were also over represented with genes that were overexpressed in 4X plants, in particular those involved in regulation of transcription and chromatin structure such as nucleosome assembly (data not shown). Therefore, we selected six up regulated genes in 4X in order to confirm microarray data by qRT-PCR. Five of these genes that coded for a cinnamoyl-CoA reductase (*CCR*), a peroxidase precursor (*Px63*), a plastocyanin chloroplast precursor (*PC*), a chlorophyll A-B binding protein (*Lhca2*) and a cell-division cycle 2 protein kinase (*Cdc2K*) were shown in previous works to be regulated by water stress, while the sixth that coded for a H1 histone was known to be involved in the regulation of gene expression (Table 4).

Quantitative data were normalized and the resulting expression values were correlated with the microarray expression log (2) ratios. qRT-PCR analysis in leaves confirmed the up regulation observed with microarrays even so those up-regulation were very limited (Fig. 4).

DISCUSSION

It is known that tetraploid genotypes, no matter if they are allotetraploid or autotetraploid, show large differences with their corresponding diploids. This suggests that the important changes that have been reported such as larger cells, decreased of stomata density (Romero-Aranda *et al.* 1997; Chen 2007), increased of the chloroplast number per cell and an increase in chlorophyll content (Byrne *et al.* 1981; Jellings and Leech 1984; Mathura *et al.* 2006) may be the result of polyploidy per se rather than a matter of heterosis.

Investigations of the morphology and the anatomy in 2X and 4X genotypes allowed to show evidence of large phenotypical differentiations that may lead to great changes in plant adaptation. In well watered condition, during a sunny day, stomata are opened and water flow in the plant tissues is mostly apoplastic. Consequently, in such conditions, we may consider that water flux through 4X leaf tissues was not limiting plant growth and development (Morillon *et al.* 2001a). In 4X, the percentage of vessel area of the leaf central nerve was significantly smaller compared to 2X (Table 2). However, we may assume that the observed limited xylem area in the 4X central nerve did not affect the water flow since vessels offer a much smaller resistance to longitudinal water flow than the transcellular and apoplastic routes (Steudle and Peterson 1998). In condition where the plant is not subjected to any water shortage, we then may assume that the principal growth limitation depends on the opening status of stomata, their size and their density, which will lead to regulation of gas exchanges and transpiration (Table 1, Fig. 1). For leaves of equivalent area, we showed that in 4X, stomata were bigger and their density was smaller, resulting in lower g_s values that were probably at the origin of lower plant growth of 4X seedling compared to 2X. In citrus, a low CO_2 assimilation rate (A_N) was observed to be due to a lower mesophyll conductance (g_m) to CO_2 (Loreto *et al.* 1992). According to Syvertsen *et al.* (1995), a greater internal resistance to CO_2 diffusion from the stomatal cavity to the site of carboxylation inside the leaf tissues would be an expected consequence in thick and dense leaves. In 4X citrus plants, it has been shown that leaves were thicker than for 2X, the mesophyll cells presenting a larger volume (Romero-Aranda *et al.* 1997), suggesting that 4X genotypes presented greater leaf water content (Burquez 1987). Indeed, we observed that fresh excised 4X leaves presented a greater water content compared to 2X (Fig. 1C). As well, in 4X Rangpur lime, we have shown that the percentage of leaf lacunar area did not seem different of the one of 2X leaves (Table 2). Altogether, those results suggested that the 2X leaf tissue was not denser than 4X. Then, the more limited g_s values we measured were probably associated with a decrease of g_m and a more limited diffusion of CO_2 inside the leaf. However, the biochemical capacity to

assimilate CO₂ was probably not limited as previously proposed (Flexas *et al.* 2004; Chaves and Oliveira 2004).

Under water deficit or salt stress conditions it has been showed that A_N , g_s and g_m are significantly decreased (Flexas *et al.* 2002; Centritto *et al.* 2003). In stress conditions, the relationships between those parameters are not easily established since they are changing depending of the environmental conditions (Loreto *et al.* 1992; Warren and Adams 2006). However, greater cellular water content and enhanced cellular water exchanges may facilitate 4X adaptation to adverse conditions. This greater water content associated with a more limited transpiration may be at the origin of a better adaptation to water shortage. Indeed, assuming that the stomata closure occurred at the same speed in 2X and 4X, we may suppose that the greater 4X leaf water content may protect more effectively against wilting. In conditions when stomata are closed such as in water deficit condition or when the transpiration rate is rather limited such as when plants are grown under high humidity conditions, trans-cellular water flow is considered more preponderant (Morillon and Chrispeels 2001a). In a single organ such as the stem, for a given distance, if we assume that the hydraulic conductivity of the plasma membrane was not changed between 2X and 4X, greater cell size would favor cell to cell water exchange, since the main limitation would be the number of membrane to cross (Morillon *et al.* 2001b). We may then expect that bigger cells in stem would speed up water exchanges and plant growth rate. Interestingly, under high humidity condition (80%, $T^\circ = 25-27^\circ\text{C}$), we observed that 4X citrus seedlings were growing faster than 2X (Sahle *et al.* 2008), suggesting a faster cellular growth that may have been improved by faster water exchanges between cells. As well, the thicker cuticle observed in the stem (Fig. 3 B, Table 2) was also visible in leaf and in roots (Fig 2F and 3D). Numerous studies showed that thicker cuticle is associated to more limited leaf water loss and then favor plant subjected to water shortage (Kerstiens 2006; Baker and Procopiou 2000). As well, we may then assume that thicker cuticles may also protect organs against wounding and could better protect plants against pests.

We performed microarray analysis to compare the transcriptomes of 2X and 4X genotypes. From the 21081 cDNAs hybridized on the microarrays only 229 ESTs (less than 1%) were differentially expressed. The number of genes and the change of gene expression are in agreement with two previous studies performed on potato showing that leaves of autotetraploid experienced similar expression pattern to diploid ones with a limited range of expression change (Supart *et al.* 2007; Guo *et al.* 1996).

Using qRT-PCR, we analyzed the expression of six selected genes in order to confirm results obtained with microarrays (Table 4). The different genes we investigated were: *CCR*, *PC*, *Lhca2*, *Px63*, *H1F* and *Cdc2K*. Cinnamoyl-CoA reductases that are encoded by *CCR* genes are key enzymes of lignin biosynthesis (Wadenback *et al.* 2008) and participate to cell wall structure. In maize roots, *CCR* genes were shown to be up regulated by water deficit and would lead to a progressive inhibition of wall extensibility and root growth and may facilitate root acclimation to drying environment condition (Fan *et al.* 2006). In a study done on cassava in drought condition, several ESTs coding for a plastocyanin chloroplast precursor (*PC*) and a Chlorophyll A-B binding protein (*Lhca2*) were shown to be up regulated by water deficit (Lokko *et al.* 2007). *Px63* encodes a peroxidase precursor, those enzymes being known to be involved in the removal of H₂O₂ that is synthesized in response to environmental stresses. Change in histone H1 gene expression may lead to changes of transcription regulation (Shen and Gorovsky 1996). Investigation of the effect of histone H1 depletion in mouse embryonic stem cells showed that dramatic structure changes, including reduced local chromatin compaction and decreases in certain core histone modification occurred (Fan *et al.* 2005). Although global DNA methylation was not changed, methylation of specific genes regulated by histone H1 was reduced. Then, for those authors, it indicated that linker histone can participate in epigenetic regulation in gene expression. Interestingly, the overexpression of H1 histone of Arabidopsis in tobacco led to a decrease of the plant growth, decreased the leaf cell size and increased the number of chloroplasts per cell (Slusarczyk *et al.* 1999). Then, it wouldn't be surprising that a subtle gene expression change of the histone H1 (*H1F*) in 4X Rangpur lime might also lead to fine regulations of other genes implicated in the differences between 2X and 4X. Ni *et al.* (2009) proposed recently that allopolyploids of Arabidopsis gain advantages from the control of circadian-mediated physiological and metabolic pathways, leading to growth vigour and increased biomass. Interestingly, in mice, it has been shown that circadian clock controls the expression of cell-cycle related genes that in turn modulate the expression of active Cyclin B1-Cdc2 kinase, a key regulator of mitosis (Matsuo *et al.* 2003). In wheat leaves, the cell-division cycle 2 protein kinase (*Cdc2K*) was shown to be phosphorylated in water deficit condition and contributed to reduce cell-division activity (Shuppler *et al.* 1998). Then, a fine over expression of *Cdc2K* in 4XRL may also be involved in the specific phenotype of 4X genotypes.

Altogether qRT-PCR experiments showed that gene expression changes between 4X and 2X were very limited (Fig. 4). The PCR analysis suggests that 4X genotypes experienced nuclear dosage compensation in leaves as previously proposed by Supart *et al.* (2007). This may lead

to very little change in gene expression of specific genes and some of these genes, such as that coding for H1 histone, might be at the origin of dramatic phenotypical changes observed in polyploids. Overall, the results presented above show that the morphological changes introduced by polyploidy in citrus are certainly not related to major dramatic changes in gene expression. Further investigations including candidate gene methylation studies are then required to confirm this hypothesis. As well, the changes in the 4X phenotype may have large consequences in plant water flux and may lead to better adaptation to adverse environmental conditions. Then, it will be required to investigate 4X Rangpur lime seedlings and rootstock grown in stress condition, in order to confirm their potential interest for the citrus industry.

FUNDINGS

Funding for Thierry Allario and for the work performed was provided by INCO UE project 015453. Additional funding come from an AGL2007-65437-C04-01 grant from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Angel Boix for technical assistance.

REFERENCES

- Adams K.L., Cronn R., Percifield R. and Wendel J. F. (2003) Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4649-4654.
- Albertin W., Brabant P., Catrice O., Eber F., Jenczewski E., Chèvre A-M. and Thiellement H. (2005) Autopolyploidy in cabbage (*Brassica Oleracea* L.) does not alter significantly the proteome of green tissues. *Proteomics* 5, 2131-2139.
- Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M. and Sherlock G. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology, pp. 25-29.
- Auger D.L., Gray A.D., Ream T.S., Kato A., Coe E.H. Jr and Birchler J.A. (2005) Nonadditive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize. *Genetics* 169, 389-397.
- Baker E.A. and Procopiou J. (2000). The leaf and fruit cuticles of selected drought tolerant plants. *Acta Horticulturae* 527, 85-93.
- Barrett H.C. and Hutchinson DJ. (1982) Occurrence of spontaneous octoploidy in apomictic seedlings of a tetraploid Citrus hybrid. *Proceedings of the international society of citriculture* 1, 29-30.
- Barrett H.C. and Rhodes A.M. (1976) Numerical Taxonomic Study of Affinity Relationships in Cultivated Citrus and Its Close Relatives. *Systematic Botany* 1, 105-136.
- Blüthgen N., Kielbasa S.M. and Herzel H. (2005) Inferring combinatorial regulation of transcription in silico. *Nucleic Acids Research* 33, 272-279.
- Brumós J., Colmenero-Flores J.M., Conesa A., Izquierdo P., Sánchez G., Iglesias D.J., López-Climent M.F., Gómez-Cadenas A. and Talón M. (2009) Membrane transporters and carbon metabolism implicated in chloride homeostasis differentiate salt stress responses in tolerant and sensitive Citrus rootstocks. *Functional and Integrative Genomics* 9, 293-309.
- Burquez A (1987) Leaf Thickness and Water Deficit in Plants: A Tool for Field Studies. *Journal of Experimental Botany* 38, 109-114.
- Byrne M.C., Nelson C.J. and Randall D.D. (1981) Ploidy effects on anatomy and gas exchanges of tall fescue leaves. *Plant Physiology* 68, 891-893.
- Cameron J.W. and Soost R.K. (1969) Characters of new populations of Citrus polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny, in: H.D. Chapman (Eds.), *Proceedings of the international society of citriculture*. University of California at Riverside 1, 199-205.

- Carpenter J.B. and Furr J.R. (1962) Evaluation of tolerance to root rot caused by *Phytophthora parasitica* in seedlings of *Citrus* and related genera. *Physiopathology* 52, 1277-85.
- Centritto M., Loreto F. and Chartzoulakis K. (2003) The use of low [CO₂] to estimate diffusional and non-diffusional limitations to photosynthetic capacity of salt-stressed olive saplings. *Plant Cell and Environment* 26, 585-594.
- Colmenero-Flores J.M., Martinez G., Gamba G., Vazquez N., Iglesias D.J., Brumos J. and Talon M. (2007) Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant Journal* 50, 278-292.
- Comai L., Tyagi A.P., Winter K., Holmes-Davis R., Reynolds S.H., Stevens Y. and Byers B. (2000) Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed arabidopsis allotetraploids. *Plant Cell* 12, 1551-68.
- Conesa A., Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Talon M. and Robles M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674-3676.
- Chaves M.M. and Oliveira M.M. (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55, 2365-2384.
- Chen Z.J. (2007) Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Annual Review of Plant Biology* 58, 377-406.
- Fan L., Linker R., Gepstein S., Tanimoto E., Yamamoto R. and Neumann P.M. (2006) Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiology* 140, 603-612.
- Fan Y., Nikitina T., Zhao J., Fleury T.J., Bhattacharyya R., Bouhassira E.E., Stein A., Woodcock C.L. and Skoultschi A. (2006) Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* 123, 1199-1212.
- Flexas J., Bota J., Escalona J.M., Sampol B. and Medrano H. (2002) Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* 29, 461-471.
- Flexas J., Bota J., Loreto F., Cornic G. and Sharkey T.D. (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology* 6, 269-279.
- Forment J., Gadea J., Huerta L., Abizanda L., Agusti J., Alamar S., Alos E., Andres F., Arribas R., Beltran J.P., Berbel A., Blazquez M.A., Brumos J., Canas L.A., Cercos M., Colmenero-Flores J.M., Conesa A., Estabes B., Gandia M., Garcia-Martinez J.L., Gimeno J., Gisbert A., Gomez G., Gonzalez-Candelas L., Granell A., Guerri J., Lafuente M.T., Madueño F., Marcos J.F., Marques M.C., Martinez F., Martinez-Godoy

- M.A., Miralles S., Moreno P., Navarro L., Pallas V., Perez-Amador M.A., Perez-Valle J., Pons C., Rodrigo I., Rodriguez P.L., Royo C., Serrano R., Soler G., Tadeo F., Talon M., Terol J., Trenor M., Vaello L., Vicente O., Vidal C., Zacarias L. and Conejero V. (2005) Development of a Citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Molecular Biology* 57, 375-391.
- Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Williams T.D., Nagaraj S.H., Nueda M.J., Robles M., Talon M., Dopazo J. and Conesa A. (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research* 36, 3420-3435.
- Guo M., Davis D. and Birchler J.A. (1996) Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* 142, 1349-1355.
- Jellings A.J. and Leech R.M. (1984) Anatomical variation in first leaves on nine Triticum genotypes and its relationship to photosynthetic capacity. *New Phytologist* 96, 371-382.
- Kerstiens G. (2006) Water transport in plant cuticles: an update. *Journal of Experimental Botany* 57, 2493-2499.
- Kashkush K., Feldman M. and Levy A. (2003) Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics* 33, 102-106.
- Levy Y. and Syvertsen J.P. (2004) Irrigation water quality and salinity effects in citrus trees. In: J. Janick (ed.). *Horticultural Reviews* 30, 37-82.
- Lokko Y., Anderson J.V., Rudd S.A., Raji A.A., Horvath D.P., Mikel M.A., Kim R.W., Liu L., Hernandez A.G., Dixon A.G. and Ingelbrecht I.L. (2007). Characterization of an 18,166 EST dataset for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) enriched for drought-responsive genes. *Plant Cell Reports* 26, 1605-1618.
- Loreto F., Harley P.C., Marco G.D. and Sharkey T.D. (1992) Estimation of mesophyll conductance to CO₂ flux by three different methods. *Plant Physiology* 98, 1437-1443.
- Lukens L.N., Pires J.C., Leon E., Vogelzang R., Oslach L. and Osborn T. (2006) Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Plant Physiology* 140, 336-348.
- Masterson J. (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of Angiosperms. *Science* 264, 421-424.
- Martinez-Godoy M.A., Mauri N., Juarez J., Marques M.C., Santiago J., Forment J. and Gadea J. (2008) A genome-wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis. *BMC Genomics* 9, 318.
- Mathura S., Fossey A. and Beck S.L. (2006) Comparative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black wattle (*Acacia mearnsii*). *Forestry* 79, 381-388.
- Matsuo T., Yamaguchi S., Mitsui S., Emi A., Shimoda F. and Okamura H. (2003) Control Mechanism of the Circadian Clock for Timing of Cell Division in Vivo. *Science*. 302, 255-259.

- Morillon R. and Chrispeels M.J. (2001a) The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14138-14143.
- Morillon R., Catterou M., Sangwan R.S., Sangwan B.S. and Lassalles J-P. (2001b). Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 212, 199-204.
- Myhre S., Tveit H., Mollestad T. and Laegreid A. (2006) Additional Gene Ontology structure for improved biological reasoning. *Bioinformatics* 22, 2020-2027.
- Ni Z., Kim E-D., Ha M., Lackey E., Liu J., Zhang Y., Sun Q. and Chen Z.J. (2009) Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* 457, 327-333.
- Nicolosi E., Deng Z.N., Gentile A., Malfa S., Continella G. and Tribulato E. (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 1155-1166.
- Quevillon E., Silventoinen V., Pillai S., Harte N., Mulder N., Apweiler R. and Lopez R. (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research* 33, 116-120.
- Romero-Aranda R., Bondada R., Syvertsen J.P. and Grosser J.W. (1997) Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autoteraploid citrus. *Annals of Botany* 79, 153-160.
- Saleh B., Allario T., Dambier D., Ollitrault P. and Morillon R. (2008) Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Comptes rendus de Biologie de l'Académie des sciences de Paris* 331, 703-710.
- Schuppler U., He P.H., John P.C.L. and Munns R. (1998) Effect of water stress on cell division and Cdc2-Like cell cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiology* 117, 667-678.
- Schwartz S.F., Juarez J., Pina J.A., Agusti M. and Navarro L. (2001) Analysis of the ploidy level of seedlings from tetraploid citrus rootstock. *Proceedings of the 6th International Congress Citrus Nurserymen* 140-143.
- Shen X. and Gorovsky M.A. (1996) Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription *in vivo*. *Cell* 86, 475-483.
- Slusarczyk J., Prymakowska-Bosak M., Przewłoka M., Jerzmanowski A. and Kuras M. (1999) Ultrastructural organization of leaves of transgenic tobacco overexpressing histone H1 from *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 84, 329-335.
- Smyth G.K. and Speed T. (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31:265-273. Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* 3 Article 3.

- Smyth G.K. (2005) limma: Linear Models for Microarray Data. In: Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, DuBois S (eds.) *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. Springer Berlin Heidelberg New York, pp. 397-420.
- Song K., Lu P., Tang K. and Osborn T.C. (1995) Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7719-7723.
- Steudle E. and Peterson C.A. (1998) How does water get through roots ? *Journal of Experimental Botany* 49, 775-788.
- Stupar R.M., Bhaskar P.B., Yandell B.S., Rensink W.A., Hart A.L., Ouyang S., Veilleux R.E., Busse J.S., Erhardt R.J., Buell C.R. and Jiang J. (2007) Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* 176, 2055-67.
- Syvertsen J.P., Lloyd J., McConchie C., Kriedemann P.E. and Farquhar G.D. (1995) On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant, Cell and Environment* 20, 867-880.
- Syvertsen J.P., Lee L.S. and Grosser J.W. (2000) Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO₂. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125, 228-234.
- Tadeo F.R., Tudela D. and Primo-Millo E. (1995) 1-Aminocyclopropane- 1-carboxylic acid-induced ethylene stimulates callus formation by cell enlargement in the cambial region of internodal explants of Citrus. *Plant Science* 110, 113-119.
- Tadeo F.R., Cercos M., Colmenero-Flores J.M., Iglesias D.J., Naranjo M.A., Rios G., Carrera E., Ruíz-Rivero O., Lliso I., Morillon R., Ollitrault P. and Talon M. (2008) Molecular physiology of development and quality of citrus. *Botanical Research: Incorporating Advances In Plant Pathology* 47, 147-223.
- Terol J., Conesa A., Colmenero J., Cercos M., Tadeo F., Agusti J., Alos E., Andres F., Soler G., Brumos J., Iglesias D., Gotz S., Legaz F., Argout X., Courtois B., Ollitrault P., Dossat C., Wincker P., Morillon R. and Talon M. (2007) Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC Genomics* 8, 31.
- Viana F.M.P., Freire F.C.O., Araújo J.R.G. and Pessoa M.N.G. (2004) Influence of scion variety on the incidence of Phytophthora gummosis in Rangpur lime rootstock in the State of Piauí, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 29, 103-103.
- Wadenback J., Arnold S., Von Egertsdotter U., Walter M.H., Grima-Pettenati J., Goffner D., Gellerstedt G., Gullion T. and Clapham D. (2008) Lignin biosynthesis in transgenic Norway spruce plants harboring an antisense construct for cinnamoyl CoA reductase (CCR). *Transgenic Research* 17, 379-392.

- Wang J., Tian L., Lee H-S., Wei N., Jiang H., Watson B., Madlung A., Osborn T., Doerge R.D., Comai L. and Chen Z.J. (2006) Genome-wide Non-additive Gene Regulation in Arabidopsis Allotetraploids. *Genetics* 172, 507-517.
- Ward R. and Durrett R. (2004) Subfunctionalization: How often does it occur? How long does it take? *Theoretical Population Biology* 66, 93-100.
- Warren C.R. and Adams M.A. (2006) Internal conductance does not scale with photosynthetic capacity: implications for carbon isotope discrimination and the economics of water and nitrogen use in photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 29, 192–201.

Table captions

Table 1. Thickness, surface area, stomatal size, stomatal density, greenness and Fm/Fv in leaves of 2X and 4X 6-months old-Rangpur lime. Mean value \pm SE with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

	Rangpur lime	
	2X (mean \pm SE)	4X (mean \pm SE)
Thickness (mm)	0.242 \pm 0.013 A	0.309 \pm 0.009 b
Surface area (cm ²)	40.5 \pm 1.15 A	38.3 \pm 1.16 a
Stomatal size (length \times width, μm^2)	290 \pm 25 A	490 \pm 19 b
Stomata density (Stomates /mm ²)	400 \pm 27 B	270 \pm 23 b
Greenness (SPAD unit)	55.2 \pm 0.7 A	75.3 \pm 0.6 b
Fm/Fv	0.715 \pm 0.011 A	0.752 \pm 0.009 b

Table 2. Anatomical characteristics of leaf, stem and root from 2X and 4X Rangpur lime seedlings.

		Rangpur lime	
Organ		2X (mean \pm SE)	4X (mean \pm SE)
Petiole	Diameter (mm)	1.47 \pm 0.09	1.52 \pm 0.04
	Cortex cell area (μm^2)	1442.6 ^{*(1)} \pm 58.2	1638.9 ^{*(1)} \pm 70.8
	Xylem cell area (μm^2)	399.1 \pm 21.4	383.0 \pm 21.0
	Medulla cell area (μm^2)	2474.8 ^{*(2)} \pm 163.1	3419.2 ^{*(2)} \pm 205.6
	% of vessels area	31.3 \pm 1.6	26.8 \pm 0.5
	Total area (mm^2)	0.155 \pm 0.018	0.180 \pm 0.008
Leaf central nerve	Diameter (mm)	1.02 \pm 0.06	0.84 \pm 0.03
	% of vessels area	25.3 ^{*(1)} \pm 0.7	18.8 ^{*(1)} \pm 0.5
	Total surface area (mm^2)	0.080 ^{*(1)} \pm 0.006	0.053 ^{*(1)} \pm 0.003
Foliar limb	Thickness (μm)	230.6 ^{*(1)} \pm 4.3	299.0 ^{*(1)} \pm 6.9
	Palisade parenchyma cells area (μm^2)	263.1 ^{*(2)} \pm 9.8	421.0 ^{*(2)} \pm 19.7
	Lacunar parenchyma cells area (μm^2)	518.0 ^{*(2)} \pm 32.3	890.7 ^{*(2)} \pm 51.9
	Epidermis cell area (μm^2)	195.7 ^{*(2)} \pm 9.3	274.9 ^{*(2)} \pm 21.0
	% of lacunar area	28.0 \pm 1.1	29.2 \pm 0.8
Stem	Stem length (mm)	2.82 \pm 0.19	3.21 \pm 0.24
	Stem width (μm)	1.8 \pm 0.1	2.31 \pm 0.1
	Cortex cell area (μm^2)	552.5 ^{*(1)} \pm 34.1	1046.9 ^{*(1)} \pm 45.0
	Xylem cell area (μm^2)	397.2 ^{*(1)} \pm 25.5	494.8 ^{*(1)} \pm 28.5
	Medulla cell area (μm^2)	2638.9 \pm 141.3	2907.0 \pm 133.6
	Epidermis cell area (μm^2)	76.4 ^{*(1)} \pm 5.6	104.1 ^{*(1)} \pm 6.8
	Cuticul thickness (μm)	1.9 ^{*(1)} \pm 0.2	4.3 ^{*(1)} \pm 0.2
	% of vessels area (μm^2)	24.2 \pm 1.5	38.4 \pm 5.0
	Total surface area (mm^2)	0.402 \pm 0.063	0.619 \pm 0.062
Root	Diameter (mm)	0.41 ^{*(2)} \pm 0.01	0.72 ^{*(2)} \pm 0.05
	Cortex cell area (μm^2)	546.0 ^{*(2)} \pm 16.2	1125.9 ^{*(2)} \pm 40.9
	Xylem cell area (μm^2)	99.4 \pm 8.1	117.0 \pm 7.1
	Epidermis cell area (μm^2)	158.1 ^{*(2)} \pm 6.9	357.2 ^{*(2)} \pm 18.1
	% of vessels area	7.5 \pm 1.1	4.8 \pm 0.7
	Total surface area (mm^2)	0.013 ^{*(1)} \pm 0.001	0.043 ^{*(1)} \pm 0.001

Values with an * were significantly different (t-test ⁽¹⁾, rank sum test ⁽²⁾)

Table 3. Relevant gene functional categories were identified as those having an Annotation Graph Score in the Blast2GO application (Goetz *et al.* 2008) equal or higher than 3 and an ontology hierarchical level greater than 4. Significantly overexpressed gene ontology (GO) categories are labelled in bold.

Relevant functional categories				
Term (Biological Process)	Overexpressed in 4X		Overexpressed in 2X	
	n ^{er} Seqs	Score	n ^{er} Seqs	Score
Cellular protein metabolic process	19	11.420	7	2.323
translation	9	6.920	2	1.359
transcription	8	4.000	2	0.720
post-translational protein modification	8	4.800	4	2.159
phosphorylation	6	4.400	4	2.800
response to abscisic acid stimulus	5	5.360	0	0.000
regulation of transcription	5	5.272	1	0.046
protein amino acid phosphorylation	4	4.000	3	3.000
response to auxin stimulus	4	3.600	0	1.642
response to gibberellin stimulus	3	3.000	0	0.000
nucleosome assembly	3	3.000	0	0.000

Table 4. Sequences of the primers used to confirm by real time RT-PCR the results of expression obtained with microarray. Annealing temperature was 55 °C.

Gene Name	Accession number	Protein encoded by the targeted gene	Rate of up and down regulation obtained from microarrays analysis	Primer sequence (5' -> 3')
<i>Cdc2K</i>	IC0AAA65AG07	Cdc2-like protein kinase	+ 1.18 x (+/-0.0001)	F: GTGGGTCTCCTGATGAAACC R: AGCATGTCCGGTCAAAGTGTC
<i>H1F</i>	KN0AAH1DF06	Histone H1F	+ 1.09 x (+/-0.0031)	F: ACCCTCCTTACTCTGAGATG R: GGAGACTAGCCTTCTGTTTC
<i>Px63</i>	IC0AAA24AF10	Peroxidase 63 precursor	+ 0.95 x (+/-0.0096)	F: AAAAGCCGCTGATGTTGAAG R: CCACTCAGAGCCACCATTTC
<i>lhca2</i>	IC0AAA41DB10	Chlorophyll A-B binding protein	+ 0.90 x (+/-0.0148)	F: TGAGACGCTGAGATGGAAC R: GGATGGAGTGTTGAGGATTC
<i>PC</i>	IC0AAA26DC03	Plastocyanin chloroplast precursor	+ 0.90 x (+/-0.0182)	F: TGTTCOAAGCTCTTTCTCTG R: CACCACTCGGAATCTCATC
<i>CCR</i>	IC0AAA41DF01	Cinnamoyl CoA reductase-like protein	+ 0.86 x (+/-0.0297)	F: GAAACTGTGTGCTTACATCG R: ATTCGTCACTCCAGGATTC

Figure captions

Figure 1: A) Growth rate of 2X and 4X Rangpur lime seedlings grown in control condition for 42 days. Growth rates were respectively 0.94 cm.day^{-1} ($r^2 = 0.99$) and 0.63 cm.day^{-1} ($r^2 = 0.99$) and were significantly different. B) Leaf stomatal conductance (g_s) of 2X and 4X Rangpur lime seedlings grown in control condition for 20 days. C) Relative leaf water loss of 2X and 4X Rangpur lime under desiccation for 100 h at 25°C . Vertical bars indicate the mean value \pm SE.

Figure 2: Light microscopy from leaf cross-section (leaf central nerve: A and B, petiole: C and D, and foliar limb: E and F). Left panels correspond to 2X, right panels correspond to 4X.

Figure 3: Light microscopy from stem cross-section (A and B) and root cross-section (C and D). Left panels correspond to 2X, right panels correspond to 4X.

Figure 4: Leaf gene expression ratio of 4X over 2X Rangpur lime through qRT-PCR. Six genes (CCR, PC, lhca2, Px63, HF1, Cdc2K) selected from microarrays were investigated. Values are means ($n= 2$) \pm SE.

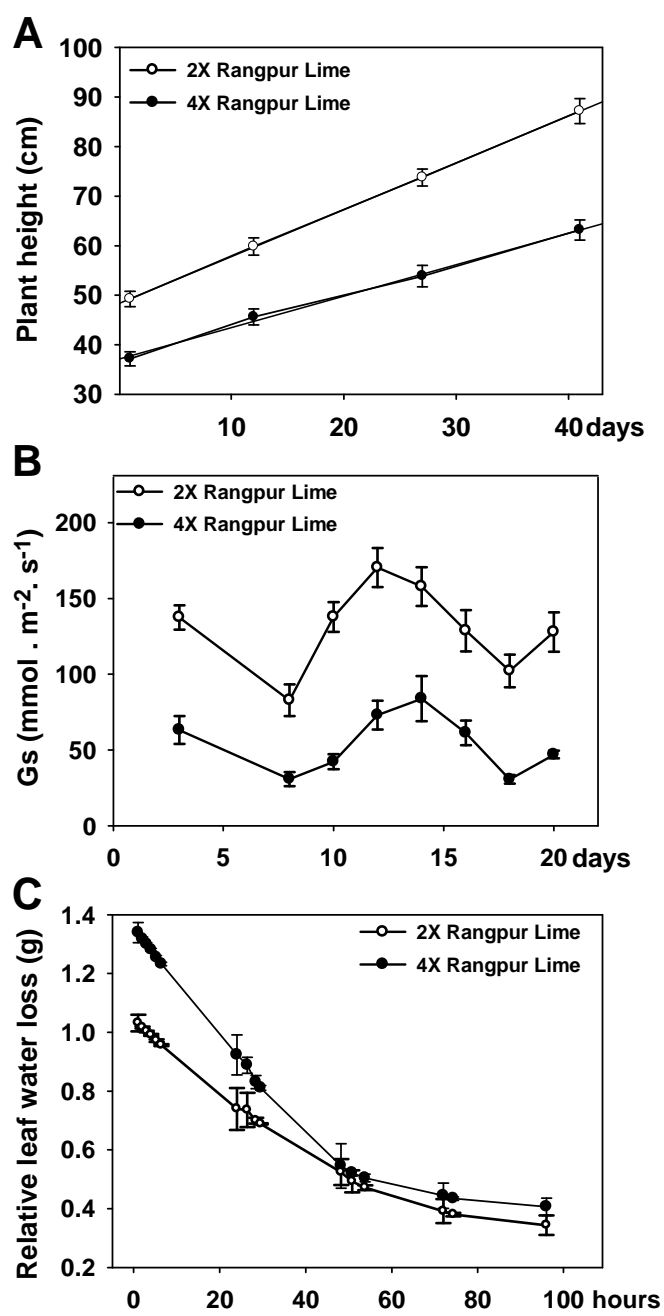
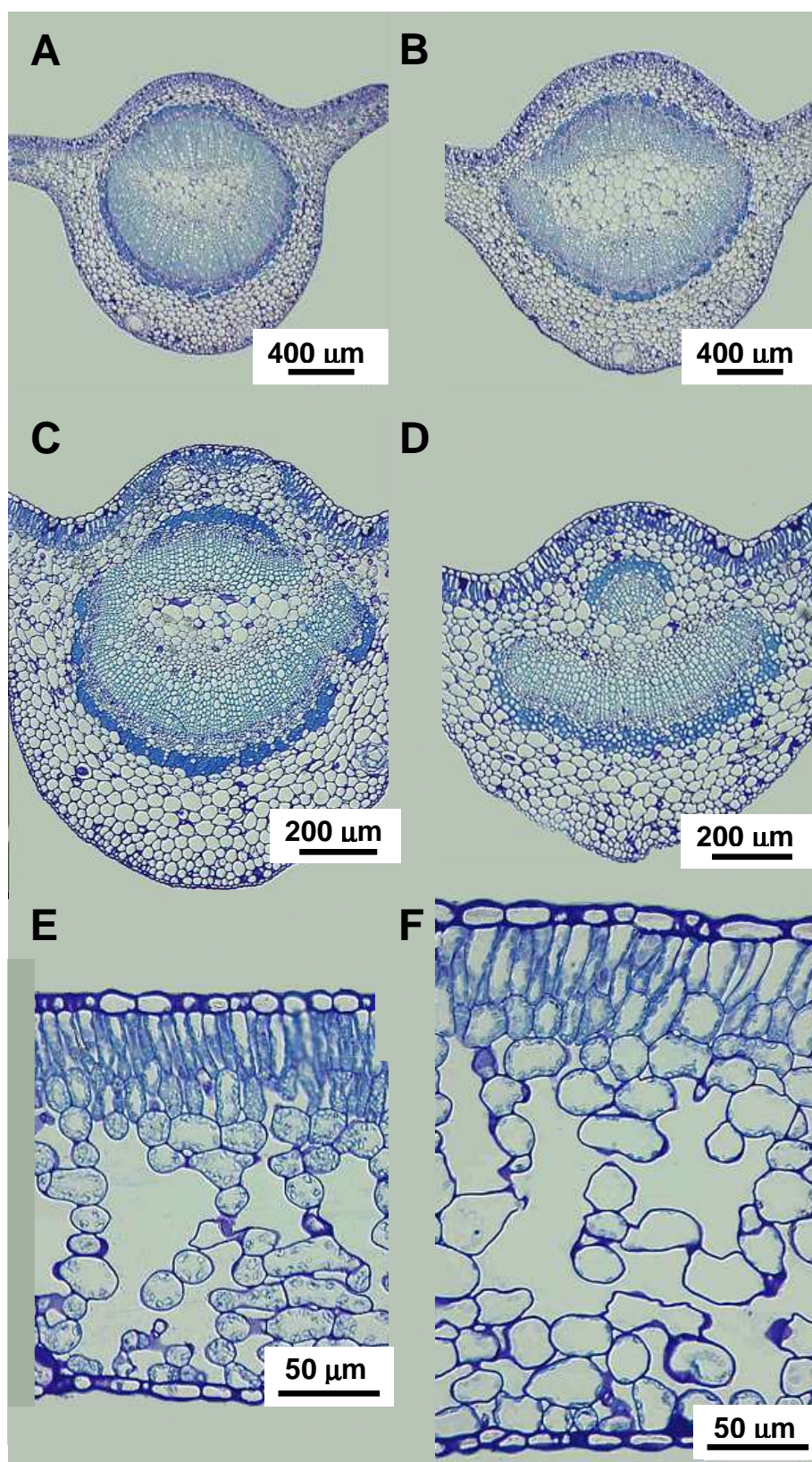
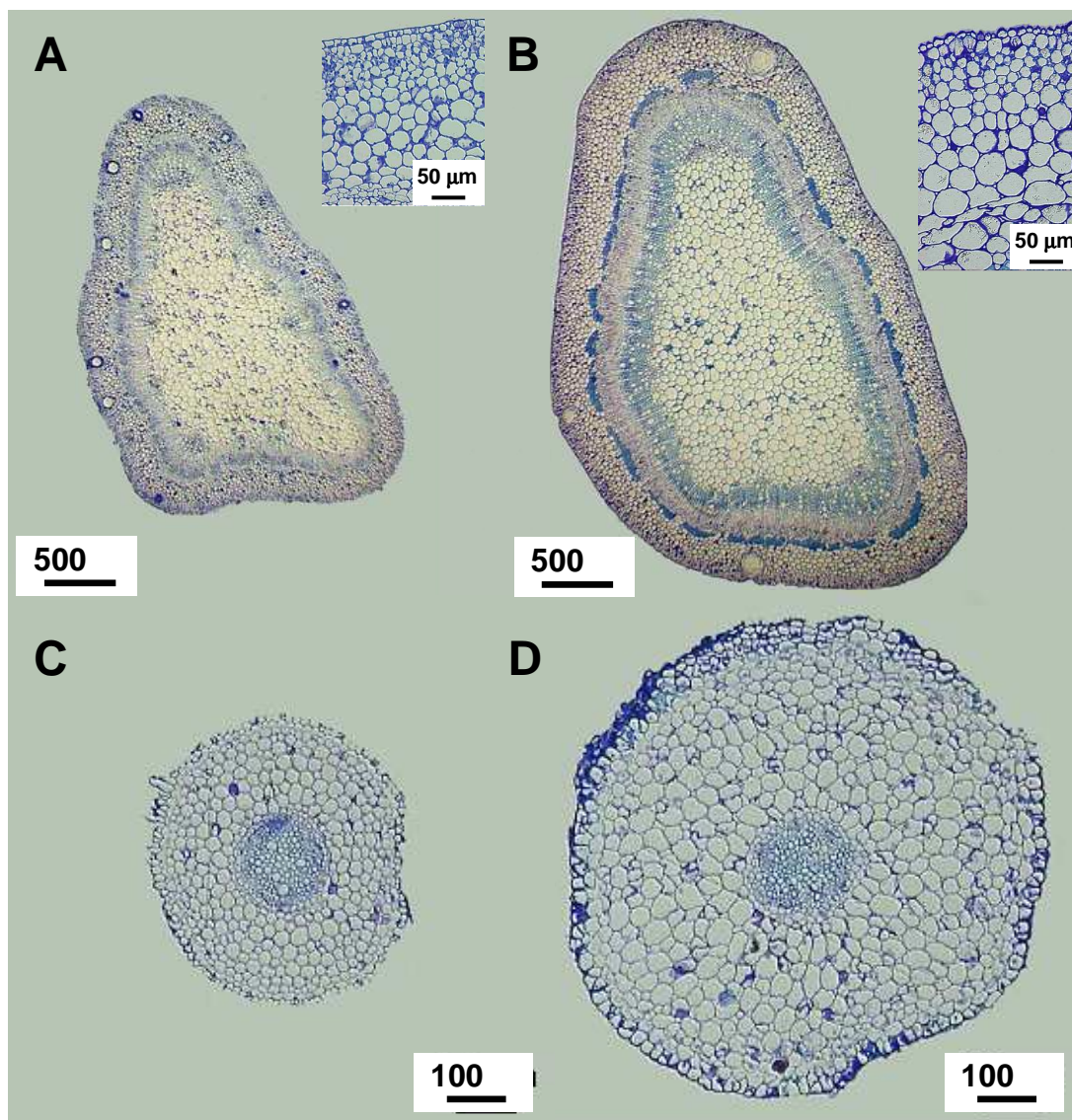
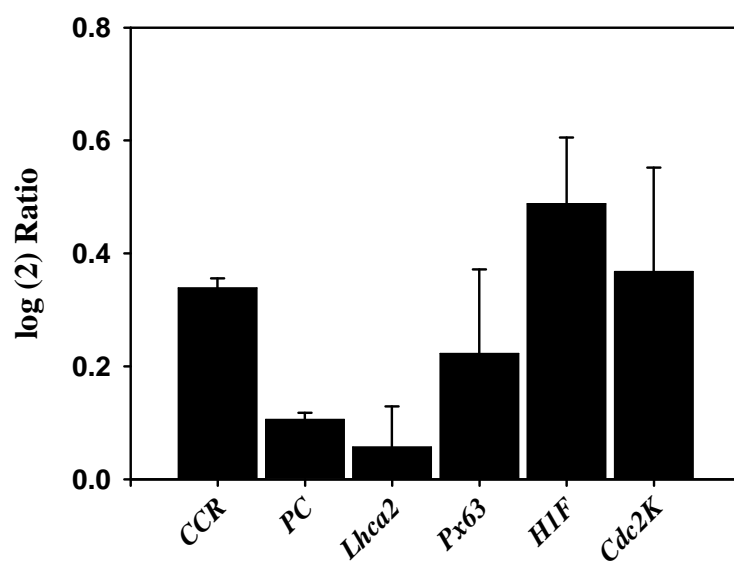


Fig. 1

**Fig. 2**

**Fig. 3**

**Fig. 4**

4.5. ARTICLE 4 : L'UTILISATION DE LA LIME RANGPUR (*CITRUS LIMONIA*, OSBECK) AUTOTETRAPLOÏDE COMME PORTE-GREFFE AMELIORE LA TOLERANCE AU DEFICIT HYDRIQUE DU CEDRATIER (*CITRUS MEDICA*)

INTRODUCTION : Alors que les périodes de sécheresse s'allongent et que la qualité des eaux d'irrigation décroît sous l'effet du réchauffement climatique, l'agrumiculture, dont une grande partie de la zone d'exploitation se trouve en région semi-aride, doit satisfaire une demande toujours plus forte suite à l'accroissement de la population mondiale. De multiples croisements entre les différents représentants des genres *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella* ont permis de développer des porte-greffes plus tolérants aux contraintes biotiques et abiotiques. Les agrumes génèrent spontanément des semences autotétraploïdes par apomixie partielle en fonction de facteurs environnementaux. L'accroissement de la taille des organes observé chez les autotétraploïdes semble d'avantage lié à une modification du dosage nucléaire qu'à une modification des régulations épigénétiques (*cf* Art.3). De même, les autotétraploïdes semblent, de part leur anatomie (*cf* Art.3), plus tolérants à de nombreux stress abiotiques tel que le stress salin (*cf* Art.1). Combiner le caractère polyploïde à des variétés issues de croisements inter/intra génériques devrait pouvoir améliorer leur niveau de tolérance. La lime Rangpur (*Citrus limonia*, Osbeck), hybride du cédratier (*Citrus medica*) et du mandarinier (*Citrus reticulata*), est connue pour être une variété très tolérante au déficit hydrique. La lime Rangpur (LR) autotétraploïde (4X) utilisée comme porte-greffe confère-t-elle une meilleure tolérance au déficit hydrique par rapport à l'emploi de porte-greffes diploïdes (2X)?

MATERIELS ET METHODES : La LR a été utilisée comme modèle dans cette étude. 24 plants de cédratiers diploïdes greffés sur lime Rangpur diploïdes (C/LR2X) et autotétraploïdes (C/LR4X) ont été soumis à un déficit hydrique en serre durant 24 jours suite à l'arrêt de l'arrosage. Les mesures de conductance stomatique (g_s), de rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}) et de pesée des pots ont été réalisées quotidiennement à la même heure. Au 24^{ème} jour, le potentiel hydrique foliaire ($\Psi_{w\ leaf}$) de chaque arbre a été déterminé à l'aide d'une chambre à pression. Une étude de l'expression génique par RT-PCR en temps réel, sur la base de gènes candidats liés au déficit hydrique, a été réalisée à partir de feuilles et de racines prélevées le dernier jour de stress : l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse d'osmoprotectant (*P5CS*, *GolS*, *RS* et *TPS*), dans la constitution des parois (*FAE*, *CCR* et *CP*), dans les systèmes de protection cellulaire (*DH*, *LEA* et *ERD4*) et de détoxification (*SOD*, *DHAR*, *GST* et *AOX*) a été étudiée. De la même manière, l'expression des gènes codant

des enzymes associés à la photosynthèse (*PSIx*, *PSIIw*, *OEE* et *CAO*) et à l'assimilation du carbone (*CA* et *PEPC*) a été analysée à partir des feuilles du cédratier.

RESULTATS ET DISCUSSION : Les plantes perçoivent la restriction d'eau au niveau de leurs racines. Un message est alors transmis de la racine aux feuilles afin d'entraîner la fermeture stomatique et de limiter les pertes d'eau par transpiration. Le messenger intervenant dans la transduction de l'information entre la racine et la feuille lors d'un déficit hydrique n'est pas clairement établi. L'ABA, qui contrôle la fermeture stomatique aux cellules de garde, pourrait jouer ce rôle tout comme le pH de la sève qui, suite à son alcalinisation, permettrait une redistribution de l'ABA entre les cellules du mésophylle et l'apoplasme de la feuille. La conductance stomatique a fortement baissé durant les 24 jours de déficit hydrique uniquement chez le C/LR2X, entraînant une chute massive du Φ_{PSII} le 23^{ème} jour. A contrario, g_s a été faiblement réduite et Φ_{PSII} est resté stable dans les mêmes conditions chez le C/LR4X. De même, la pesée des pots a montré que, sur 24 jours, les pertes d'eau étaient plus importantes chez le C/LR2X. Or, les mesures de g_s effectuées en début d'expérience associées aux mesures effectuées sur plants contrôles tout au long de l'expérience ont montré que g_s était 2 fois plus importante chez le C/LR2X que chez le C/LR4X. Après 24 jours de déficit hydrique, les mesures de $\Psi_{w\ leaf}$ ont établi que seul le C/LR2X était affecté par le déficit hydrique. L'étude de l'expression de gènes cibles réalisée par RT-PCR en temps réel ont corroboré ces résultats. En effet, alors que des gènes codant des protéines participant à la photosynthèse (*PSIIw*), à l'assimilation du carbone (*CA*), aux systèmes de protection cellulaire et de détoxification (*SOD* et *DHAR*) étaient réprimés, d'autres gènes codant les protéines contribuant à la synthèse d'osmoprotectant (*GolS*, *RS* et *TPS*) et à la constitution des parois (*FAE*, *CCR* et *CP*) étaient surexprimés uniquement chez le C/LR2X exposé au déficit hydrique. De nombreux gènes étaient également réprimés au niveau de la racine de la LR2X. Aucune modification notable de l'expression de ces gènes n'a été observée chez le C/LR4X entre plants témoins et stressés. Ces résultats suggèrent que le C/LR4X a conservé plus longtemps ses réserves en eau dans le substrat grâce à une diminution du niveau d'ouverture stomatique qui semble être une conséquence du greffage sur la LR4X. Ceci a permis de maintenir stable le statut hydrique des C/LR4X durant 24 jours sans apport d'eau. Il reste à déterminer avec exactitude quel est le messenger, de l'ABA et/ou du pH, qui pourrait être à l'origine de ce phénomène.

ARTICLE N°4

USE OF AUTOTETRAPLOID RANGPUR LIME (*CITRUS LIMONIA*) AS A ROOTSTOCK IMPROVES WATER DEFICIT TOLERANCE OF CITRON (*CITRUS MEDICA*)

T. Allario, J. Brumos, J.M. Colmenero-Flores,
M. Talon, L. Navarro, P. Ollitrault, R. Morillon

USE OF AUTOTETRAPLOID RANGPUR LIME (*CITRUS LIMONIA*, OSBECK) AS A ROOTSTOCK IMPROVES WATER DEFICIT TOLERANCE OF CITRON (*CITRUS MEDICA*)

Thierry Allario¹, Javier Brumos², Jose Manuel Colmenero-Flores², Manuel Talon², Luis Navarro³, Patrick Ollitrault¹ and Raphaël Morillon¹

¹Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

²Centro de Genómica. IVIA. 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

³Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. IVIA. 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

ABSTRACT

Citron (*Citrus medica*) grafted on diploid (2X) or autotetraploid (4X) Rangpur lime (*Citrus limonia* Obs.) (RL) rootstocks were subjected to a water deficit for 24 days. The stomatal conductance (g_s), the quantum yield of photosystem II electron chain (Φ_{PSII}) as well as the substrate humidity were periodically monitored. At the end of the stress, the water potential of Citron leaves was measured and samplings of RL roots (2X and 4X) and the Citron leaves were harvested to investigate the expression of candidate genes involved in osmoticum synthesis, antioxidant synthesis and detoxification, cell walls constitution, as well as biosynthesis of enzymes involved in CO₂ fixation and photosynthetic reaction or Heat Shock Protein which protects proteins and membranes against unfavourable structure changes. Our aim was to investigate water deficit tolerance of a variety (Citron) grafted on autotetraploid rootstock (C/4XRL) compared to the same variety grafted on diploid rootstock (C/2XRL). No change was observed in gene expression profile in C/4XLR between control condition and water deficit, whereas C/2XLR stressed plants presented an over-expression of genes involved in osmoticum synthesis and cell wall constitution, and a down regulation of genes involved in antioxidant synthesis, biosynthesis of enzymes involved in CO₂ fixation and photosynthetic reaction. In the meantime, in control condition, the leaf stomatal conductance of C/4XLR was reduced when compared to C/2XLR. Physiological studies and candidate gene expression suggest that grafting on 4XRL improves water deficit tolerance by limiting constitutively leaf stomata opening.

KEYWORDS : autotetraploid, citrus, gene expression, water deficit, rootstock

INTRODUCTION

Global warming changes worldwide the climate. Increase in global temperature affects the amount and pattern of precipitations (Sen, 2009). This phenomenon is involved in subtropical desert expansion leading to many environmental consequences like extended period of drought, species extinctions and decrease in agricultural yields. Semi-arid and arid areas are the most exposed to desertification (Houerou, 1993; Niu et al. 2007). Citrus crops are grown in these areas. To face the extended period of drought, citrus growers changed their agricultural practices by using drip irrigation. However, providing new rootstocks that are more tolerant to biotic abiotic constraints is still a requirement for the maintaining of a sustainable citrus industry. Depending of their property for biotic and abiotic stress tolerance and yield and fruit quality conferred to the scion, rootstocks were selected to produce new hybrids. Numerous combinations of hybrids (Barrett, 1985) were made but because of the time required to validate a new rootstock takes decades, the offer of new rootstocks such citrange as C35 to growers is quite limited. Then, it is now essential to investigate more widely the citrus germplasm resources to produce rootstocks more tolerant.

Polyembryony and apomixis are two phenomena occurring in Citrus plant. Polyembryony allows multiple embryos developments from the egg cell whereas apomixis authorizes asexual reproduction. Due to partial apomixes, nucelar embryo may be present in the seed with the zygotic embryo. Then, nucelar embryos are true clones since they inherited an identical genome of the mother tree (Sanchez-Damas et al. 2006). However, cytological data have shown that meiosis in apomicts may be malfunctional or completely bypassed (Pazy, 1998; Noyes, 2008). Thus, meiosis may be altered leading to the making of an unreduced egg cell Autopolyploidization, unlike allopolyploidization which results from zygotic genome doubling, occurs only in nucellar embryo. One of the most drought tolerant varieties known in Citrus genus is Rangpur lime (*Citrus limonia*, Osbeck) (RL). Like most Citrus, RL is a diploid (2X: two sets of chromosomes) genotype that can spontaneously generates autotetraploids (4X: four sets of chromosomes) seedlings. Interestingly, 4X plants present a specific anatomy and morphology that will lead to specific characteristics in the plant. It has been reported that 4X plants have higher photosynthetic rate and cell size (Warner and Edwards, 1993); higher number of chloroplast per stomata guard cell (Dabrowska, 1996); higher stomata size with lower density (Beck et al. 2003), thicker leaf, stem and root (Otto and Whitton, 2000). All of these characteristics seem to make citrus tetraploid better than diploid to endure abiotic stresses like drought (Syvertsen et al. 2000; Saleh et al. 2008). Even if allotetraploids plants are today well documented, little is known about autotetraploids plants. In allotetraploids

plants, gene expression is modified by both hybridation and genome doubling involving both genetic and epigenetic mechanisms (Comai, 2000). Because an autotetraploid plant results from the same genome doubling, there is no genetic change due to hybridation in autotetraploid plant. Chromosomal rearrangements (alteration in cytosine methylation patterns, rapid silencing in ribosomal RNA and protein-coding genes, and de-repression of dormant transposable elements) induced by polyploidisation should be the main factor that affect gene expression in autotetraploids plants (Weiss-Schneeweiss et al. 2007). Surprisingly, very few changes were reported concerning gene expression pattern between autotetraploid and diploid plants. This suggests that autotetraploid traits result more than gene dosage that epigenetic change (Stupar et al. 2007). In a recent study, we observed that 4X Rangpur Lime seedlings experienced very limited gene expression changes when compared to 2X genotypes (Allario et al, submitted). We proposed that subtle genes changes of a limited number of genes may be at the origin of the phenotypical differences observed between 4X and 2X seedlings. Different rootstocks may be used depending of their specific characteristics to improve crops yield under increasing abiotic and biotic constraints (Levy and Syvertsen, 2004). Then, we investigated 2X Citron grafted on 2XRL and 4XRL (C/2XRL and C/4XRL) facing a severe drought stress. Gene expression of candidate genes was as well investigated in order to clarify what would be the molecular determinism of this better tolerance observed in C/4XRL.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Diploids (2X) and autotetraploids (4X) seedlings of Rangpur lime (*Citrus limonia*, Osbeck ; 2X: IVIA 334, 4X: IVIA 516) were provided by the IVIA germoplasm, Spain. Seedlings were grown up in soil located in a greenhouse for one year. The ploidy status of 2X and 4X plants was checked by flow cytometry (Partec I, France). 2X Citron (*Citrus medica*) was grafted on 2X and 4X Rangpur lime (RL) and plants were grown up for one year more in greenhouse (day/night temperature at 25-29°C/16-18°C). A total of 12 uniform plants of each combination was selected and transplanted on a mixture of sand, turf and peat (1:1:1) substrate in 3 L pots one month before the experiment started.

Experiment conditions

Water deficit was performed in greenhouse condition (day/night temperature at 25-29°C/16-18°C; relative humidity at 40-90%) during 24 days at the end of spring season in Spain (Valencia). Water stress was applied by stopping watering. Plants in control condition were watered at field capacity every days with water supplemented with standard nutrient solution composed of 3 mol m⁻³ Ca(NO₃)₂, 3 mol m⁻³ KNO₃, 2 mol m⁻³ MgSO₄, 2.3 mol m⁻³ H₃PO₄, 17.9 mmol m⁻³ Fe-ethylenediamine dihydroxyphenyl acetic acid and trace elements.

Stomatal conductance (gs), quantum yield of PSII electron transport (Φ_{PSII}) and pot weight measurement

Leaf stomatal conductance (*gs*) was daily monitored by using a leaf porometer (SC-1, Decagon Device) along the experiment (24 days). As well, quantum yield of PSII electron transport was checked every day by using a leaf fluorometer (Fluorpen FP 100, Qubitsystems) (Percival, 2005). Each measurement (*gs* and Φ_{PSII}) was performed on labelled and mature. Six C/4XRL and six C/2XRL plants were investigated in control or water deficit condition. Three leaves per plant were monitored whereas 3 measurements per leaf were performed. Plants were daily weighted all along the experiment. Substrate evaporative water loss was daily monitored by weighting a pot without plant.

Leaf water potential ($\Psi_{w,leaf}$) measurements and sampling

Water potential on mature leaves was measured with a pressure bomb (Scholander et al. 1965) the last day of the experiment. As well, this same day leaf and root samplings were harvested. Young and old leaves were discarded. Three independent biological replicates of leaves and roots were harvested from Citron (leaves) and 2X/4XRL (roots) in order to investigate gene expression profile between stressed and control plants depending of rootstock ploidy. For each

tree, leaves sampled, as roots, were pooled together, put in liquid nitrogen and, then, stored at -80°C.

RNA isolation

Total roots and leaves RNA was prepared using a “hot phenol” method (de Vries et al. 1982), treated with RNase-free DNase-I (Invitrogen) to remove traces of genomic DNA and then purified with the EZNA Plant Mini Kit (Omega Bio-Tek, Inc.). RNA quality was checked by UV absorption spectrophotometry using the Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA.) and gel electrophoresis as describe by Sambrook et al. (1989).

Real time reverse transcriptase PCR

Quantitative real-time reverse transcription (qRT)-PCR was performed with a LightCycler 2.0 Instrument (Roche) equipped with LightCycler Software version 4.0 according to the procedure reported by Colmenero-Flores et al. (2007).

Primer design

Genes analysed by (qRT)-PCR have been looked for among all sequences in the non-redundant databases using the BLASTN and TBLASTX algorithms in the citrus EST database (CFGP database, Citrus Functional Genomic project, <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/bioinfo.ibmcp.upv.es>). Primers used in real time (qRT)-PCR (Tab. 1) were defined using the Oligo Explorer software (Gene Link™, <http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>) to select primer pairs with minimal number of potential primer dimmers and primer hairpins as possible.

Drought-induced candidate genes

In order to investigate gene expression profile by (qRT)-PCR in grafted plants under water deficit and control condition, several genes were selected from representative functional groups involved in water stress in plants. Those functional groups included genes coding for osmoticum, antioxidant and detoxification enzymes, Heat Shock Protein-like protecting enzymes and cell membranes, compounds of cell walls, photosynthetic enzymes and CO₂ fixation enzymes. Six groups were defined (Tab. 1). The osmoticum synthesis group includes Delta¹-pyrroline-5- carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants (P5CS) (Kishor et al. 1995); Galactinol synthase (GolS) and Raffinose synthase (RS), involved in raffinose oligosaccharides (RFOs) synthesis which act as osmoprotectant (Li and Wang, 2008); Trehalose-6-phosphate synthase (TPS) responsible of trehalose synthesis, a disaccharide well known to osmotically protect cell membranes during dehydration (Yeo et al. 2000). The antioxidant synthesis and detoxification group is

represented by CuZn Super Oxide Dismutase (SOD) involved in Reactive Oxygen Species (ROS) cell detoxification (Borsani et al., 2001); Dehydroascorbate reductase (DHAR), one of the two important enzymes functioning in the regeneration of ascorbate (AsA), a potent antioxidant protecting plants against oxidative damage imposed by environmental stresses (Bian and Jiang, 2009); Glutathione *S*-transferase (GST) utilizing glutathione to play an important role in plant defence mechanisms (Bianchi et al, 2002); Mitochondrial alternative oxidase (AOX), the unique respiratory terminal oxidase in plants, which protects the photosynthetic electron transport chain from the harmful effects of excess light (Bartoli et al. 2005). The Heat Shock Protein (HSP) like protein group is composed with Dehydrin (DH), a distinct biochemical group of late embryogenesis abundant (LEA), which protects proteins and membranes against unfavourable structure changes caused by dehydration in plant cells (Qian et al. 2008); Early Responsive to Dehydration 4 protein (ERD4), that is strongly produced during a drought stress and seems to play an important protective role in plant cells (Kiyosue et al. 1994); Late Embryogenesis Abundant I protein (LEA), found in vegetative plant tissues following environmental stress, which is widely suspected to play crucial roles in cellular dehydration tolerance (Hu, 2008). The group of proteins involved in cell walls constitution like putative Fatty Acid Elongase (FAE) which one provides compounds making membrane and wax layer (Qin et al. 2007; Ni and Guo, 2008); Cinnamoyl-CoA reductase (CCR) which participates to produce lignin, a major compounds of the secondary cell walls of plants (Leple et al. 2007); Cuticle protein (WAX2), a component of the protective cuticle synthesised at the epidermis cell of leaves (Sanchez et al. 2001). The photosynthetic protein group includes Photosystem I subunit X (*psaK*) (Rensburg and van Kruger, 1993), Photosystem II reaction center W protein chloroplast (*psbW*) (Yuan et al. 2005; Murata et al. 2007), Chloroplast oxygen-evolving enhancer protein (OEE) (Sugihara et al. 2000; Heide et al. 2004) and Chlorophyllide a oxygenase chloroplast (CAO) (Tanaka et al. 2001) which ones are implicated in light-harvesting complexes and chain electron transport to proceed photosynthetic reaction. The last group is composed by two enzymes involved in CO₂ fixation, Carbonic anhydrase (CA) (Wu et al. 2006) and Phosphoenolpyruvate carboxylase 2 (PEPC) (Schmitt, 1990; Saccardy et al. 1996). *psaK*, *psbW*, *OEE*, *CAO*, *CA* and *PEPC* genes were only investigated in Citron because there are more specific to leaf than root.

Statistical analysis

Data are expressed by the mean value \pm SE. SIGMASTAT from SPSS (Chicago; www.spss.com_software_science) was used to data analyze. *t* test, Mann-Whitney rank sum

test and ANOVA test were used to detect differences between genotypes in water stress and control condition at the usual probability level of $P < 0.05$.

RESULTS

Physiological data from Citron grafted on diploid Rangpur lime (C/2XRL) and Citron grafted on autotetraploid Rangpur lime (C/4XRL) under severe water deficit

Evolution of water deficit traits in C/2XRL and C/4XRL are shown in Fig. 1. The first day, in absence of any water limitation, the mean g_s value of C/2XRL was two fold higher than g_s from C/4XRL. Difference of g_s values observed the first days between C/2XRL and C/4XRL (Fig. 1A) were correlated with g_s measurements reported in control condition (Fig. 2). g_s was significantly much higher for C/2XRL ($64.04 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) than for C/4XRL ($45.71 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) in control condition. Along the 24 days of water deficit, g_s strongly decreased for C/2XRL whereas g_s was slightly decreased for C/4XRL (Fig. 1A). In C/2XRL g_s decreased drastically to reach a mean value of $4 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ after 24 days without watering. Water stress strongly decreased Φ_{PSII} values from 0.70 to 0.54 the 24th day of stress in C/2XRL whereas Φ_{PSII} was still stable with a value circa 0.73 in C/4XRL (Fig. 1B). To monitor water loss during the experiment, each plant was weighted daily (Fig. 1C). C/2XRL and C/4XRL lost respectively 850g and 250g after 24 days of water withdrawing. At the end of the experiment, the 24th day, a picture was taken showing clearly that only C/2XRL were wilted (Fig. 4A). This picture was correlated to $\Psi_{\text{w.leaf}}$ measurements we performed that clearly indicated that C/2XRL genotypes were the only ones that were affected by the water deficit. $\Psi_{\text{w.leaf}}$ of C/2XRL and C/4XRL were respectively -2.2 MPa and about -1.1 MPa. In control condition C/2XRL and C/4XRL genotypes presented values similar to C/4XRL stressed plants (Fig. 4A).

Drought-induced candidate genes expression in Citron grafted on diploid Rangpur lime (C/2XRL) and autotetraploid Rangpur lime (C/4XRL)

In order to determinate what would be the molecular determinants of the better tolerance we observed for the C/4XRL association we investigated the expression of drought-induced candidate genes in leaves (Fig. 3A). Gene expression in C/2XRL and C/4XRL grown in control condition and water stress conditions was analysed. 24 selected genes coding for 6 proteins groups involved in homeostasis, detoxification, walls synthesis, or involved in proteins and membranes protection against unfavourable structure changes caused by dehydration in plant cells such as HSP-like proteins, as well as in photosynthetic reaction and carbon assimilation, were selected. In C/4XRL, no significant change in leaf gene expression between control and water stress conditions was observed. The absolute values of the stress/control gene expression ratios in leaves from C/4XRL were minor than 1. In C/2XRL, 10 genes were up or down regulated with absolute values of the stress/control gene expression

ratios superior to 1 (Fig. 3). *RS*, *GolS* and *TPS* genes that known to be involved in plant homeostasis were shown to be up regulated respectively of 1.7, 2 and 3.1 fold in C/2XRL leaves. The same tendency was observed for genes implicated in walls synthesis. Indeed, *FAE*, *CCR* and *WAX2* genes were respectively up regulated of 1.1, 2.5 and 2.9 fold in C/2XRL leaves. Genes, involved in detoxification, photosynthetic reaction or carbon assimilation, were unaffected or down regulated. In C/2XRL leaves, expression profile were shown to be down regulated for *SOD*, *DHAR*, *psbW* and *CA* genes that coded respectively for 2 detoxification enzymes (-1.7 fold, -1.7 fold), 1 photosynthetic enzyme (-2 fold) and 1 CO₂ fixation enzyme (-4.9 fold). There was no change of *DH*, *ERD4* and *LEA* gene expression between C/2XRL and C/4XRL (Fig. 3A).

We then to evaluate which the state stress of 2XRL and 4XRL was, water stress targets genes expression were investigated in roots (Fig. 3B). As we did for Citron leaves, we investigated the gene expression in roots for C/2XRL and C/4XRL associations. Gene expression was monitored for plants grown in control and stress conditions. 12 genes coding for 4 proteins groups involved in homeostasis, detoxification, HSP-like protein and walls synthesis were investigated. As observed in Citron leaves from C/4XRL, no change in gene expression was observed in C/4XRL roots. Whereas the absolute values of control/stress gene expression ratios of C/4XRL were minus than 1, 1 gene was up regulated and 6 genes were down regulated for C/2XRL in roots. *GolS* was 1.5 fold up regulated whereas *P5CS*, *SOD*, *GST*, *DH*, *LEA* and *FAE* were down regulated with, respectively, -1.4 fold, -2.2 fold, -2.2 fold, -2.3 fold, -1.4 fold and -1.8 fold in C/2XRL (Fig. 3B).

DISCUSSION

During dehydration, plants sense first a water shortage in the root. A signal, which could be an increasing level of abscisic acid (ABA) (Liang et al. 1997; Roelfsema and Hedrich, 2002) or a change in pH sap (Hartung et al. 1990; Wilkinson, 1999), is conveyed by sap from root to shoot. This signal drives stomatal closure to the leaf in order to limit water loss by transpiration. Reduction in leaf stomatal conductance (g_s) limits water loss but also limit carbon dioxide (CO_2) uptake. CO_2 assimilation decreases and Calvin cycle, which is coupled to photosynthetic reaction to produce ATP, slow down. Some enzymes involved in CO_2 fixation like ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBPCO) or Carbonic anhydrase (CA) are affected by water stress (Lawlor and Cornic, 2002; Xu and Zhou, 2007). Without water vapour loss and CO_2 uptake, photosynthesis decreases and photosystem II (PSII) complex is disassembled (Lu and Zhang, 1998; Lauriano et al. 2004). Chronologically, the first events occurring during water stress is stomatal closure that will lead to a decrease in CO_2 assimilation and photosynthesis. In our hand g_s decreased continuously for C/2XRL, whereas g_s of C/4XRL fell slightly during water deficit (Fig. 1A). The monitoring of Φ_{PSII} showed a dramatic drop the 23th day of the stress only in C/2XRL that suggested a strong deleterious effect of the water deficit on photosynthetic activity for those plants (Fig. 1B). When water deficit period is extended just after the closure of the stomates, plants face the osmotic stress by synthesizing osmoticum such as raffinose, galactose (raffinose oligosaccharides) and trehalose respectively encoded by *RS*, *GolS*, and *TPS* were up regulated in Citron leaves from C/2XRL (Fig. 3A) (Nishizawa et al. 2008; Li and Wang, 2008; Iordachescu and Imai, 2008).

However, with the progressive cell turgor loss, cell structures have to be reinforced (Santosh Kumari Arya, 2005). Thus, it is not surprising that genes involved in wall synthesis were shown to be up regulated in stressed C/2XRL leaves. Indeed, *CCR* that participate to lignin biosynthesis, a major component of wood, was strongly up regulated as well as *FAE* and *WAX2*. *FAE* synthesises fatty acids that participate to wax composition (Riederer and Schneider, 1990; Qin et al. 2007; Ni and Guo, 2008). With *FAE*, *WAX2* allows an increase of the thickness of the wax layer. Increasing wax layer thickness under water stress allows reducing water loss though the cuticle and makes surface leaves more water resistant (Oosterhuis et al. 1988; Olmos et al. 2007). Concomitantly, *SOD* and *DHAR* that belonged to the antioxidant synthesis/detoxification group, *psbW* from the photosynthetic protein group and *CA* from the CO_2 assimilation group were as well down regulated.

Increasing stomatal resistance limits water exchange with atmospheric CO₂ at the stomatal pore. The lack of CO₂ decreases enzyme activities involved in carbon fixation like CA (Xu and Zhou, 2007) and this, combined to water availability decline, contributes to photosynthesis disorders and PSII instability (Yuan et al. 2005; Murata et al. 2007). *psbW* gene expression inhibition could be correlated to the values of Φ_{PSII} at the end of water deficit experiment showing water stress impact on photosynthesis activity (Fig. 3A and 1B). It is interesting to note that only *psbW* and no *psaK* was affected by water deficit, which was shown to be specific of a drought plant response, PSI activity being only slightly affected when PSII is the main target of water stress, especially in drought sensitive cultivars (Rensburg and van Kruger, 1993; Lauriano et al. 2004). *GST* and *AOX* gene expression was not changed. As well the slight down regulation of *SOD* and *DHAR* gene expression we observed was not expected. However, it is possible that the stress was so advanced that antioxidant enzymes became inhibited. A similar result was also observed in 2XRL root (Fig. 3B). *SOD* and *GST*, but also genes coding for protective proteins like *DH*, *ERD4* and *LEA*, were down regulated, suggesting that 2XRL root were indeed strongly affected by water deficit (Krishnamurthy et al. 2000; Pinheiro et al. 2008). FAE that is involved in wax cuticle synthesis in leaf is also implicated in cell wall synthesis, which is essential to cell expansion in control condition (Evenson and Post-Beittenmiller, 1995; Qin et al. 2007). Due to the strong osmotic stress experienced by plants, cell expansion was probably very limited which is in agreement with the down regulation of FAE we observed in 2XRL root. Enzymes involved in osmoticum biosynthesis were also affected. *GalS* was up regulated and *P5CS* was down regulated whereas no changes in gene expression profiles of *RS* and *TPS* were observed. These enzymes that have been shown to be up regulated at the beginning of an osmotic stress (Liu et al. 1998; El-Bashiti et al. 2005) were progressively down regulated due to the advanced status of the stress in 2XRL root.

Notably, no change in gene expression profile between control condition and water stress in C/4XRL either in leaf (Citron) or in root (4XRL) was observed. Also, there was no difference between control condition and water stress in C/4XRL leaf concerning Φ_{PSII} values. Only *gs* decreased very slightly in C/4XRL leaf during the water deficit (Fig. 1A and 1B). While no variation of $\Psi_{w,leaf}$ was observed between control condition and water stressed in C/4XRL, a significant $\Psi_{w,leaf}$ difference appears between control condition and water stressed in C/2XRL (Fig. 4A). $\Psi_{w,leaf}$ from C/2XRL subjected to water deficit decreased roughly of two fold compared to $\Psi_{w,leaf}$ from C/2XRL grown in control condition. This stressed phenotype was

illustrated by the picture that was taken the 24th day of the water deficit that clearly showed that C/2XRL leaves were wilted and that was consecutive to loss of the shoot turgor (Fig. 4B). Taken all together, these results show clearly that Citron water deficit tolerance was enhanced by a grafting on 4XRL. Interestingly, the first day before to apply the water deficit, leaf g_s values of C/2XRL were two fold higher than C/4XRL g_s (Fig. 1A). This was confirmed by the mean g_s value measured in control condition between C/2XRL and C/4XRL (Fig. 2).

When the water deficit was initiated C/2XRL presented g_s values significantly higher than C/4XRL. This remained true until the 13th day, g_s values being then similar for the following week. Then, during the two first weeks, those higher g_s values experienced by C/4XRL could be at the origin of the greater pot water loss observed in C/2XRL compared to C/4XRL (Fig. 1C). Therefore, the water resources in the substrate were available for a longer time in C/4XRL pots. Later, from the 19th to the 24th day, C/4XRL maintained a stomatal conductance circa $50 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ that probably allowed to maintain a minimum activity of the metabolism while C/2XRL experience a dramatic decrease of g_s that was associated with a severe water deficit phenotype (Fig. 4B). Thus, it can be assumed that grafting Citron on 4XRL rootstock enhanced Citron water deficit tolerance by limiting constitutively the stomatal conductance of the leaves.

Then, it is quite evident that the origin of the better tolerance of the 4X rootstock/2X variety association was due to the rootstock itself leading to a decrease of leaf stomatal conductance.

We may hypothesise that a signal transmitted to shoot by root could be at the origin of the lower g_s values observed in C/4XRL. This signal could be ABA (Liang et al. 1997; Roelfsema and Hedrich, 2002), which could be constitutively more synthesised in 4X root than 2X root leading to change of g_s . pH of the sap could be a more basic in 4X root than in 2X root leading to a modification of the ABA distribution between mesophyll cells and guard cells throughout the apoplastic pathways (Hartung et al. 1990; Wilkinson, 1999). Both hypotheses take into account that ABA and pH sap are assumed to play a major role in signal transduction from root to shoot when water stress takes place. A greater ABA content in leaf and /or pH change of the sap in 4X could lead to a partial constitutive closure of stomata in control condition.

In conclusion, these results clearly suggest that grafting Citron on 4XRL limits g_s compared to Citron grafted on 2XRL. Limiting g_s at Citron leaves by grafting on 4XRL makes Citron more tolerant to water deficit than Citron grafted on 2XRL. Citron g_s limitation certainly comes from 4XRL root signal that is constitutively expressed and could be translocated to the

scion. ABA concentration and pH sap should be then investigated in 4XRL in order to confirm this hypothesis.

FUNDINGS

Funding for Thierry Allario and for the work performed was provided by INCO UE project 015453.

REFERENCES

- Bartoli, C. G. Gomez, F. Gergoff, G. Guiamet, J. J. Puntarulo, S. 2005. Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of Experimental Botany*. 56: 415, 1269-1276. 38.
- Barrett, H.C. 1985. Hybridization of citrus and related genera. *Fruit Varieties J., University Park*, 39: 11-16.
- Beck, S. L. Dunlop, R. W. Fossey, A. 2003. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). *Bot. J. Linn. Soc.* 141, 177-181.
- Bian, S. M. Jiang, Y. W. 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae*. 120: 2, 264-270. 36.
- Bianchi, M. W. Roux, C. Vartanian, N. 2002. Drought regulation of *GST8*, encoding the *Arabidopsis* homologue of ParC/Nt107 glutathione transferase/peroxidase. *Physiologia Plantarum*. 116: 1, 96-105.
- Borsani, O. Diaz, P. Agius, M. F. Valpuesta, V. Monza, J. 2001. Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. *Plant Science*. 161: 4, 757-763. 42.
- Colmenero-Flores JM, Martinez G, Gamba G, Vazquez N, Iglesias DJ, Brumos J, Talon M. 2007. Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant Journal* 50:278–292.
- Comai, L. 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology*. 43: 2/3, 387-399. 109.
- Dabrowska, J. 1996. The number of chloroplasts in stomata guard cells - a useful character for separating polyploids and diploids. *Beitrag zur Zuchtforschung - Bundesanstalt fur Zuchtforschung an Kulturpflanzen*. 2: 1, 239-243. 24.
- De Vries SC, Springer J, Wessels JGH. 1982. Diversity of abundant mRNA sequences and patterns of protein synthesis in etiolated and greened pea seedlings. *Planta* 156:129–135.
- El-Bashiti, T. Hamamc, H. Oktem, H. A. Yucel, M. 2005. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Science*. 169: 1, 47-54. 34.
- Evenson, K. J. Post-Beittenmiller, D. 1995. Fatty acid-elongating activity in rapidly expanding leek epidermis. *Plant Physiology*. 109: 2, 707-716. 47.
- Hartung, W. Slovik, S. Baier, M. 1990. pH changes and redistribution of abscisic acid within the leaf under stress. *Monograph - British Society for Plant Growth Regulation*. 21, 215-236. 42.

- Heide, H. Kalisz, H. M. Follmann, H. 2004. The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. *Journal of Plant Physiology*. 161: 2, 139-149.
- Houerou, H. N. 1993. Climatic changes and desertification. *Secheresse*. 4: 2, 95-111. 81.
- Hu, T. Z. 2008. *OsLEA3*, a late embryogenesis abundant protein gene from rice, confers tolerance to water deficit and salt stress to transgenic rice. *Russian Journal of Plant Physiology*. 55: 4, 530-537.
- Iordachescu, M. Imai, R. 2008. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. (Special Issue: Understanding abiotic stresses and the solution.) *Journal of Integrative Plant Biology*. 50: 10, 1223-1229. 43.
- Kishor, P. B. K. Hong ZongLie Miao GuoHua Hu, C. A. A. Verma, D. P. S. 1995. Overexpression of Delta¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108: 4, 1387-1394. 36.
- Kiyosue, T. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, K. 1994. Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes. *Plant Molecular Biology*. 25: 5, 791-798. 32.
- Krishnamurthy, K. S. Ankegowda, S. J. Saji, K. V. 2000. Water stress effects on membrane damage and activities of catalase, peroxidase and superoxide dismutase enzymes in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal of Plant Biology*. 27: 1, 39-42. 12.
- Lauriano, J. A. Ramalho, J. C. Lidon, F. C. Matos, M. do C. 2004. Peanut photosynthesis under drought and re-watering. *Photosynthetica*. 42: 1, 37-41. 34.
- Lawlor, D. W. Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. (Special issue: Drought stress) *Plant, Cell and Environment*. 25: 2, 275-294.
- Leple, J. C. Dauwe, R. Morreel, K. Storme, V. Lapierre, C. Pollet, B. Naumann, A. Kang KyuYoung Kim, H. Ruel, K. Lefebvre, A. Joseleau, J. P. Grima-Pettenati, J. Rycke, R. de Andersson-Gunneras, S. Erban, A. Fehrle, I. Petit-Conil, M. Kopka, J. Polle, A. Messens, E. Sundberg, B. Mansfield, S. D. Ralph, J. Pilate, G. 2007. Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. *Plant Cell*. 19: 11, 3669-3691.
- Levy, Y. and Syvertsen, J.P. 2004. Irrigation water quality and salinity effects in citrus trees. In: J. Janick (ed.). *Horticultural Reviews*. 30: 37-82.
- Li Fang Wang XiaoFeng 2008. Advance in raffinose family oligosaccharides metabolism and the key enzymes in plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 28: 4, 852-859. 66.
- Liang JianSheng Zhang JianHua Wong, M. H. 1997. How do roots control xylem sap ABA concentration in response to soil drying? *Plant and Cell Physiology*. 38: 1, 10-16. 29.

- Liu, J. J. J. Krenz, D. C. Galvez, A. F. Lumen, B. O. 1998. Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. *Plant Science (Limerick)*. 134: 1, 11-20. 30.
- Lu CongMing Zhang JianHua 1998. Effects of water stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition in wheat plants. *Australian Journal of Plant Physiology*. 25: 8, 883-892. 42.
- Murata, N. Takahashi, S. Nishiyama, Y. Allakhverdiev, S. I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetics*. 1767: 6, 414-421.
- Ni Yu Guo YanJun 2008. Progress in the study on genes encoding enzymes involved in biosynthesis of very long chain fatty acids and cuticular wax in plants. *Hereditas (Beijing)*. 30: 5, 561-567. 49.
- Nishizawa, A. Yabuta, Y. Shigeoka, S. 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*. 147: 3, 1251-1263.
- Niu ShuLi Han XingGuo Ma KePing Wan ShiQiang 2007. Field facilities in global warming and terrestrial ecosystem research. *Journal of Plant Ecology*. 31: 2, 262-271.
- Noyes, R. D. 2008. Sexual devolution in plants: apomixis uncloaked? *BioEssays*. 30: 9, 798-801. 28.
- Olmos, E. Sanchez-Blanco, M. J. Ferrandez, T. Alarcon, J. J. 2007. Subcellular effects of drought stress in *Rosmarinus officinalis*. *Plant Biology*. 9: 1, 77-84. 42.
- Oosterhuis, D. M. Parker, M. L. Wulschleger, S. D. Kim, K. S. 1988. The citrus leaf cuticle in relation to measurement of leaf water potential using thermocouple psychrometers. *Plant, Cell and Environment*. 11: 2, 129-135. 25.
- Otto, S. P. Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34, 401-437.
- Pazy, B. 1998. Diploidization failure and apomixis in Orobanchaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 128: 1, 99-103. 17.
- Percival, G. C. 2005. The use of chlorophyll fluorescence to identify chemical and environmental stress in leaf tissue of three oak (*Quercus*) species. *Journal of Arboriculture*. 31: 5, 215-227. 36.
- Pinheiro, C. Carvalho, M. H. C. de Bartels, D. Ricardo, C. P. Chaves, M. M. 2008. Dehydrins in *Lupinus albus*: pattern of protein accumulation in response to drought. *Functional Plant Biology*. 35: 1, 85-91.
- Qian Gang Liu YingHua Ao DiShu Yang Fan Yu MaoQun 2008. Differential expression of dehydrin genes in hull-less barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) depending on duration of dehydration stress. *Canadian Journal of Plant Science*. 88: 5, 899-906. 25.

- Qin YongMei Hu ChunYang Pang Yu Kastaniotis, A. J. Hiltunen, J. K. Zhu YuXian 2007. Saturated very-long-chain fatty acids promote cotton fiber and *Arabidopsis* cell elongation by activating ethylene biosynthesis. *Plant Cell*. 19: 11, 3692-3704.
- Rensburg, L. van Kruger, G. H. J. 1993. Differential inhibition of photosynthesis (*in vivo* and *in vitro*), and changes in chlorophyll *a* fluorescence induction kinetics of four tobacco cultivars under drought stress. *Journal of Plant Physiology*. 141: 3, 357-365. 50.
- Riederer, M. Schneider, G. 1990. The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles. II. Composition of soluble cuticular lipids and correlation with transport properties. *Planta*. 180: 2, 154-165. 35.
- Roelfsema, M. R. G. Hedrich, R. 2002. Studying guard cells in the intact plant: modulation of stomatal movement by apoplastic factors. (Special issue: Stomata) *New Phytologist*. 153: 3, 425-431.
- Saccardy, K. Cornic, G. Brulfert, J. Reyss, A. 1996. Effect of drought stress on net CO₂ uptake by *Zea* leaves. *Planta*. 199: 4, 589-595. 27.
- Saleh, B. Allario, T. Dambier, D. Ollitrault, P. Morillon, R. 2008. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *C. R. Biol.* 331, 703-710.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, F. J. Manzanares, M. Andres, E. F. de Luis Tenorio, J. Ayerbe, L. 2001. Residual transpiration rate, epicuticular wax load and leaf colour of pea plants in drought conditions. Influence on harvest index and canopy temperature. *European Journal of Agronomy*. 15: 1, 57-70. 40.
- Sanchez-Damas, J. J. Avitia-Garcia, E. Castillo-Gonzalez, A. M. Villegas-Monter, A. Corona-Torres, T. 2006. Anatomical study of polyembryony in three citrus rootstocks. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 12: 2, 145-152. 20.
- Santosh Kumari Arya, D. S. 2005. Absciscic acid accumulation under water and temperature stress and its role in cell structure, morphology, transpiration and yield in wheat. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*. 20: 1, 25-31. 5.
- Schmitt, J. M. 1990. Rapid concentration changes of phosphoenolpyruvate carboxylase mRNA in detached leaves of *Mesembryanthemum crystallinum* L. in response to wilting and rehydration. *Plant, Cell and Environment*. 13: 8, 845-850. 25.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.
- Sen, Z. 2009. Global warming threat on water resources and environment: a review. *Environmental Geology*. 57: 2, 321-329.
- Stupar, R. M. Bhaskar, P. B. Yandell, B. S. Rensink, W. A. Hart, A. L. Ouyang, S. Veilleux, R. E. Busse, J. S. Erhardt, R. J. Buell, C. R. Jiang, J. M. 2007. Phenotypic and

- transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics*. 176: 4, 2055-2067.
- Sugihara, K. Hanagata, N. Dubinsky, Z. Baba, S. Karube, I. 2000. Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant and Cell Physiology*. 41: 11, 1279-1285. 23.
- Syvertsen, J.P. Lee, L.S. and Grosser, J.W. 2000. Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO₂. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 125: 228-234.
- Tanaka, R. Koshino, Y. Sawa, S. Ishiguro, S. Okada, K. Tanaka, A. 2001. Overexpression of chlorophyllide *a* oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 26: 4, 365-373. 58.
- Warner, D. A. Edwards, G. E. 1993. Effects of polyploidy on photosynthesis. *Photosynthesis Research*. 35: 2, 135-147. 72.
- Weiss-Schneeweiss, H. Schneeweiss, G. M. Stuessy, T. F. Mabuchi, T. Park JeongMi Jang ChangGee Sun ByungYun 2007. Chromosomal stasis in diploids contrasts with genome restructuring in auto- and allopolyploid taxa of *Hepatica* (Ranunculaceae). *New Phytologist*. 174: 3, 669-682.
- Wilkinson, S. 1999. pH as a stress signal. *Plant Growth Regulation*. 29: 1/2, 87-99. 90.
- Wu YanYou Li XiTeng Hao JianChao Li PingPing Wang BaoLi 2006. Study on the difference of the activities of carbonic anhydrase in different plants. *Guangxi Zhiwu / Guihaia*. 26: 4, 366-369. 16.
- Xu ZhenZhu Zhou GuangSheng 2007. Photosynthetic recovery of a perennial grass *Leymus chinensis* after different periods of soil drought. *Plant Production Science*. 10: 3, 277-285. 43.
- Yeo EunTaeg Kwon HawkBin Han SangEun Lee JoonTak Ryu JinChang Byun MyungOk 2000. Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (*TPS1*) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells*. 10: 3, 263-268. 21.
- Yuan Shu Liu WenJuan Zhang NianHui Wang MaBin Liang HouGuo Lin HongHui 2005. Effects of water stress on major photosystem II gene expression and protein metabolism in barley leaves. *Physiologia Plantarum*. 125: 4, 464-473.

Table captions**Table 1.** Sequences of primers used by real time RT-PCR

Gene Name	Accession number	Protein encoded by the targeted gene	Role of the protein encoded	Primer sequence (5' -> 3')	Ta (°C)
<i>DH</i>	C31207C07	Dehydrin	Osmoticum synthesis	F: GCCACCGAGTTTGAGAAAG R: GTGGATCGGTGAAGTTTGTC	55
<i>P5CS</i>	C34107H03	Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase		F: CTAGGAAAGCACCATACGAG R: GAGGCCCTCTACATCACTC	55
<i>RS</i>	C05076C10	Raffinose synthase		F: TCGACGTTATCCATTGCTG R: CACCATTGCCCTTGAAGTG	55
<i>GolS</i>	C31402D06	Galactinol synthase		F: CCATGGCCTATTATGTCATC R: CATCAGGCAAGTCAAACAG	55
<i>TPS</i>	C31403D05	Trehalose-6-phosphate synthase		F: AGGGGATGACCGTTCTGATG R: GCCATGCTCGGTTTCTGAC	55
<i>SOD</i>	C31504C12	CuZn superoxide dismutase	Antioxydant synthesis Detoxification	F: GGAAGTGTTCCTTTAGCG R: TGCCTATGTTTCCGTAAGTG	55
<i>DHAR</i>	C31402E11	Dehydroascorbate reductase		F: AGCCCAGAAGGGAAAGTACC R: AGGCAAATTCAGGAGGATTG	55
<i>GST</i>	C07010G07	Glutathione S-transferase GST 22		F: AATCGCGAGCTATCATAAGG R: CTACTTCCAGCCATTGTTCC	55
<i>AOX</i>	KN0AAP7YK07	Alternative oxidase mitochondrial precursor		F: GCGTAAGTTCCAGCATAGTG R: CCTCCAAGTAGCCAACAAC	55
<i>ERD4</i>	C01019H06	Early Response to Dehydration protein 4	HSP-like protein	F: CGCTGCCCTGCTACTGTAC R: CCATGCTAGGGGTTTCCTTC	55
<i>LEA</i>	C34209G11	Group I late embryogenesis abundant protein		F: GCGACGGAGAAGAAAGAGG R: CACCACCCCTTCAATCACC	55
<i>FAE</i>	C32009D10	Putative fatty acid elongase	Wall synthesis	F: GGGGCTTGAAGAATACAGG R: AATGCCTCAGCTAAAGAAGG	55
<i>CCR</i>	C34205C03	Cinnamoyl-CoA reductase-like protein		F: CCTTGCAAAGACACTATCTG R: GATTGAGGGTTCTGTTGAG	55
<i>WAX2</i>	C02002B06	Cuticle protein		F: CTCGATGGAACACAAAAGG R: AGTGGTAATGGGTGAAAAGG	55
<i>psbW</i>	C31604G05	Photosystem II reaction center W protein chloroplast precursor	Photosynthetic protein	F: CTGTTGGGTGTTTTTGGTC R: TGGGTTTGGCTTTAGACTTC	55
<i>psaK</i>	C05072A10	Photosystem I subunit X		F: CGTTGTGGCTTCATTGGTTC R: CCGTTGCTTTCTGTTTGC	55
<i>OEE</i>	C31604E09	Chloroplast oxygen-evolving enhancer protein		F: CTCAGGTTCTTTGTTCAAG R: TGGCTCATCAGAGTTCAAC	55
<i>CAO</i>	C31601G07	Chlorophyllide a oxygenase chloroplast precursor		F: TACCTATGGAGGCACTTTG R: CACCCCTAGTTTGTCGTAAC	55
<i>CA</i>	C01015D11	Carbonic anhydrase	Carbon assimilation	F: CACCAGCTCCTATCATCAAC R: GCAACAGGTTTCAAGTCTTC	55
<i>PEPC</i>	C16013C03	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2		F: CCAAGCCTACACTCTGAAG R: TAGGGTTAAGCCTCACAAG	55

Figure captions

Figure 1: A) Leaf stomatal conductance (g_s) of C/2XRL (○) or C/4XRL (▽) under water deficit during 24 days. B) Quantum yield of PSII measured on C/2XRL in control condition (●) or water deficit (○) and on C/4XRL in control condition (▼) or water deficit (▽). C) Weighing pots for C/2XRL in control condition (●) or water deficit (○) and C/4XRL in control condition (▼) or water deficit (▽) each day of the experiment. Evaporative water loss was evaluated by weighting pot without plant everyday (black line). The experiment was repeated twice again. Vertical bars indicate the mean value \pm SE. Significant difference (*) by Mann-Whitney rank sum test (1) or t-test (2).

Figure 2: Leaf stomatal conductance (g_s) of C/2XRL or C/4XRL in control condition. Measurements were taken along of the experiment and pooled. Vertical bars indicate the mean value \pm SE. Significant difference (*) by Mann-Whitney rank sum test (1).

Figure 3: A) Leaf ratio gene expression profile of Citron under water deficit over control condition for C/2XRL and C/4XRL trough real-time RT-PCR. B) Root ratio gene expression profile of RL under water deficit over control condition for 2XRL and 4XRL trough real-time RT-PCR. Unlike C/2XRL, no significant change of expression was observed for C/4XRL at the leaf (Citron) or the root (4XRL). Real-Time RT-PCR values are means ($n=2$) \pm SE.

Figure 4: A) Leaf water potential estimated for C/2XRL and C/4XRL in control condition (black) and water deficit (white) at the 24th day of the experiment. The experiment was repeated twice again. Vertical bars indicate the mean value \pm SE. Significant difference (*) by t-test (2). B) Pictures of C/4XRL (left) and C/2XRL (right) after 24 days without watering.

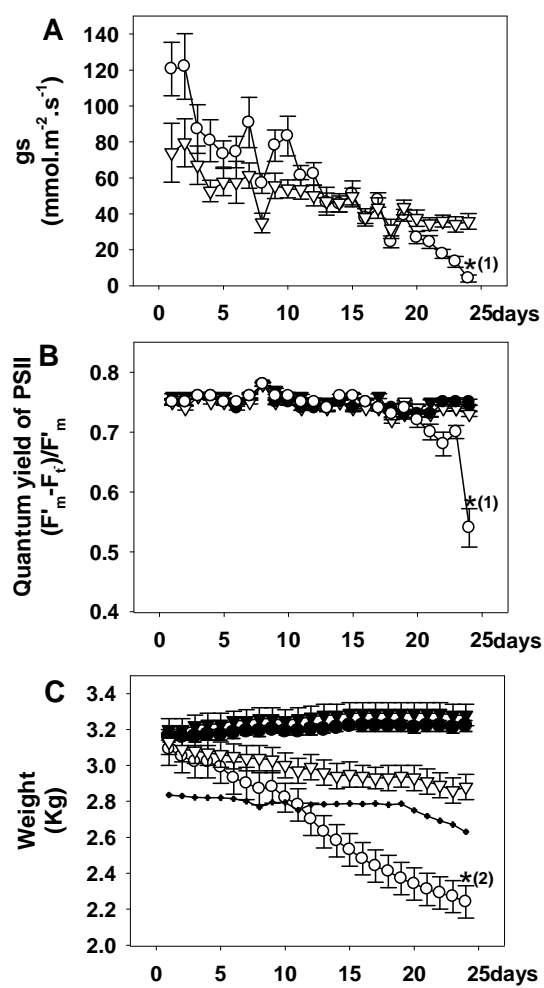
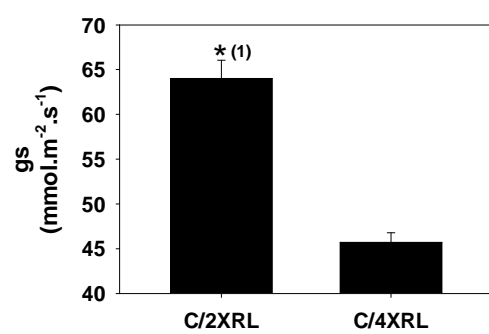
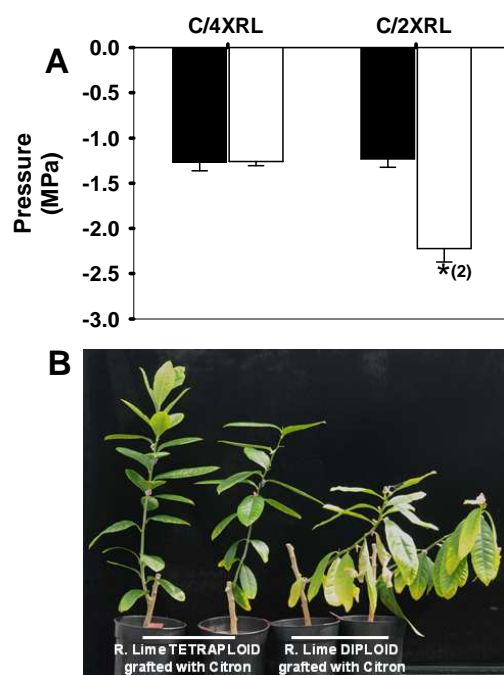


Fig. 1

**Fig. 2**

**Fig. 4**

4.6. ARTICLE 5 : LA PLUS GRANDE TOLERANCE AU DEFICIT HYDRIQUE DE L'ORANGER VALENCIA DELTA (*CITRUS SINENSIS*) GREFFE SUR LA LIME RANGPUR (*CITRUS LIMONIA*) AUTOTETRAPLOIDE EST MEDIEE PAR UNE SUR-EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA TOLERANCE AU DEFICIT HYDRIQUE AU NIVEAU DE LA RACINE

INTRODUCTION : La polyplœdie est frœquente dans le rœgne vœgœtal, car elle confœre des avantages adaptatifs par rapport œ la diploœdie. Ceci est la consœquence du phœnomœne de subfonctionnalisation qui s'opœre par des modifications de rœgulation œpigœnœtique chez les allopolyploœides : l'accroissement de l'hœtœrozygotie par le nombre de copie chromosomique permet une spœcialisation de plusieurs copies de gœnes dans des fonctions complœmentaires conduisant œ un nouveau caractœre, gœnœralement organe spœcifique, favorisant l'adaptation au milieu. Ainsi, il a œtœ reportœ que les allotœtraploœides chez le blœ, le prunier et le bouleau œtaient plus tolœrant au dœficit hydrique que leurs diploœides respectifs. Cependant, la subfonctionnalisation serait d'avantage la consœquence de l'œvœnement d'hybridation combinœe œ celui de la polyploœidisation plutœt qu'œ l'œvœnement de polyploœidisation lui-mœme. De fait, la subfonctionnalisation ne devrait pas avoir lieu chez les autopolyploœides puisque ceux-ci sont le rœsultat du doublement d'un mœme sous-gœnome, *i.e.* sans œvœnements d'hybridation. En effet, l'œtude des profils d'expression du transcriptome entre la pomme-de-terre diploœide et autotœtraploœide a montrœ peu de diffœrences, suggœrant que les modifications de rœgulations œpigœnœtiques engendrœes par le doublement chromosomique n'entraœneraient que des changements limitœs des profils d'expression gœnique. Les phœnotypes observœs chez les autotœtraploœides (accroissement de la taille cellulaire et de l'œpaisseur des organes, diminution de la conductance stomatique, etc.) serait le fait d'un effet dose du nombre de copies des gœnes (*cf* Art.3). Ces aspects morphologiques seraient impliquœs dans les diffœrences de tolœrances aux stress abiotiques observœes entre les plants autotœtraploœides (4X) et diploœides (2X) (*cf* Art.1). Les porte-greffes sont utilisœs en agrumiculture afin de pallier les effets des contraintes biotiques et abiotiques. Ils influent sur la fructification, la croissance et les relations hydriques du greffon. La lime Rangpur (LR) est une variœtœ tolœrante au froid et au dœficit hydrique, mais trœs sensible au Phytophthora. L'utilisation de la LR4X comme porte-greffe permettrait elle d'amœliorer la tolœrance au dœficit hydrique observœe chez l'oranger Valencia delta greffœ sur la LR2X ? Quels sont les dœterminismes de la tolœrance au dœficit hydrique entre les porte-greffes LR4X et LR2X ?

MATERIELS ET METHODES : 10 plants de LR4X et 10 plants de LR2X greffés avec l'oranger Valencia delta 2X ont été étudiés en condition témoin et en condition de stress hydrique modéré durant 31 j. Le stress a été appliqué par arrêt de l'arrosage avec ensachage des pots. L'évolution du stress a été évaluée par pesée des pots, par mesure de l'humidité relative du substrat, du rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}) et de la conductance stomatique (g_s) des greffons. Des échantillons de racines et de feuilles prélevés en fin d'expérience ont permis de réaliser des dosages de l'ABA et d'effectuer une étude du transcriptome de l'oranger Valencia delta au moyen de puces à ADN et par PCR en temps réel. Le taux d'expression de gènes candidats a également été étudié par PCR en temps réel à partir des racines de la LR4X et de la LR2X.

RESULTATS ET DISCUSSION : La faible g_s et l'épaisseur importante des organes et de la cuticule observée chez la LR4X pourraient être des traits contribuant à améliorer la tolérance au déficit hydrique des plants 4X par rapport aux plants 2X (*cf* Art.3). Alors que le greffage de l'oranger Valencia delta sur la LR4X n'a entraîné aucune modification anatomique des feuilles (taille stomatique, épaisseur foliaire et g_s), g_s mesurée à partir des feuilles du greffon était divisée par deux en condition témoin par rapport à l'oranger Valencia delta greffé sur la LR2X. Ceci suggère que la diminution de g_s observée chez le greffon était consécutive au greffage sur la LR4X. L'ABA, principal médiateur biochimique connu pour être véhiculé par la sève de la racine aux feuilles et conduisant à la fermeture stomatique lors d'un déficit hydrique, a été dosée en plus grande quantité au niveau des feuilles et de la racine chez l'oranger Valencia delta greffé sur la LR4X en condition témoin. En l'absence de déficit hydrique, il peut être considéré que l'ABA a été produite en plus grande quantité dans la racine de la LR4X. Ce fait semble être vérifié par l'étude qRT-PCR du gène *NCED* qui, contrôlant la synthèse de l'ABA via la voie de biosynthèse des caroténoïdes, est surexprimé au niveau de la racine de la LR4X par rapport à la racine de la LR2X en condition témoin. Cependant, la fermeture stomatique s'est déclenchée en même temps entre les plants greffés sur LR4X et sur LR2X au cours du stress hydrique. Toutefois, les valeurs de Φ_{PSII} et le taux d'humidité du substrat ont chuté plus rapidement chez l'oranger greffé sur LR2X que chez l'oranger greffé sur LR4X, suggérant que les orangers greffés sur LR2X étaient plus stressés. L'étude du transcriptome au moyen de puces à ADN a montré que trois fois plus de gènes étaient surexprimés chez l'oranger greffé sur LR2X, en particulier les gènes impliqués dans la réponse aux stress abiotiques. De même, les gènes codant les enzymes de la photosynthèse et de la fixation du carbone étaient plus fortement réprimés chez l'oranger greffé sur LR2X suggérant que l'état de stress était plus avancé chez les orangers greffés sur LR2X que ceux

greffés sur LR4X. L'étude réalisée par qRT-PCR à partir d'échantillons de racines de tous les génotypes a également montré un état de stress plus avancé chez la LR2X, mais a également mis en évidence que la plupart des gènes impliqués dans la tolérance aux stress abiotiques étaient constitutivement surexprimés chez la LR4X par rapport à la LR2X en condition témoin.

ARTICLE N°5

THE HIGHER WATER DEFICIT TOLERANCE OF VALENCIA SWEET ORANGE (*CITRUS SINENSIS*) GRAFTED ON AUTOTETRAPLOID RANGPUR LIME (*CITRUS LIMONIA*) ROOTSTOCK IS MEDIATED BY AN OVER EXPRESSION IN ROOT OF GENES INVOLVED IN WATER DEFICIT TOLERANCE

T. Allario, J. Brumos, J.M. Colmenero-Flores, D.
Iglesias, F. Tadeo, M. Talon, L. Navarro, P. Ollitrault,
R. Morillon

THE HIGHER WATER DEFICIT TOLERANCE OF VALENCIA SWEET ORANGE (CITRUS SINENSIS) GRAFTED ON TETRAPLOID RANGPUR LIME (CITRUS LIMONIA) ROOTSTOCK IS MEDIATED BY AN OVER EXPRESSION IN ROOT OF GENES INVOLVED IN WATER DEFICIT TOLERANCE

Thierry Allario^{1,2}, Javier Brumos², Jose Manuel Colmenero-Flores^{2,4}, Domingo Iglesias², Manuel Talon², Luis Navarro³, Patrick Ollitrault^{1,3} and Raphaël Morillon^{1,2}

¹Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

²Centro de Genómica. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

³Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

⁴Current address: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Av Reina Mercedes 10, 41012-Sevilla, Spain.

ABSTRACT

Polyploidy imposes dramatic changes in plants leading to a large phenotypical differentiation that may lead to better environmental constraints tolerance. In autotetraploid, since no epigenetic change was ever reported, it has been proposed that gene dosage may occur depending the studied organ and may be at the origin of the phenotypical differentiation and the better adaptation to stress. We characterized the water deficit tolerance of diploid (2X) and autotetraploid (4X) Rangpur lime (*Citrus limonia*) rootstocks grafted with Valencia delta sweet orange (*Citrus sinensis*). Autotetraploid Rangpur Lime rootstocks grafted with Valencia (4X RL/V) were shown to be more resistant to water deficit than the respective diploid Rangpur Lime rootstocks grafted with Valencia (2X RL/V). In control condition, leaves of 4X RL/V presented lower stomatal conductance than 2X RL/V. As well, a greater ABA content was observed in 4X root and leaves of 4X RL/V compared to 2X RL/V genotypes. Under stress conditions, 2X RL/V experienced a faster water loss and a faster decrease of the relative soil humidity compared to 4X RL/V genotypes. Using a citrus microarray containing 21081 genes, we analyzed the transcriptomes of water-stressed Valencia delta orange leaves obtained from shoots grafted onto both 2X and 4X RL rootstocks. A larger number of genes were found to be differentially regulated by water deficit in 2X RL/V (904 genes) compared to 4X RL/V (346 differentially expressed genes), indicating a higher sensitivity to stress in 2X-grafted than in 4X-grafted Valencia delta shoots. Gene expression, monitored through qRT-PCR on a set of selected genes up and down regulated by stress, confirmed microarray

results. In roots of water-stressed plants, these same genes were more expressed in 2X than in 4X, supporting the idea that 2X genotypes were experiencing a much more pronounced water deficit. Under control conditions, qRT-PCR revealed that gene expression changes in leaves between 2X RL/V and 4X RL/V was very limited. Interestingly, expression of the same set of genes in roots of well-watered plants was much higher in 4X RL/V than in 2X RL/V. Furthermore, a great up regulation of the *NCED 1* gene involved in ABA biosynthesis was also observed in non-stressed 4X roots compared to 2X roots. Altogether, these results suggest that under control conditions, higher level of ABA is constitutively synthesized in the tetraploid rootstock and leads to grafted plants pre-acclimatized to water deficit stress.

KEYWORDS : polyploids, citrus, gene expression, water deficit, stress response

INTRODUCTION

Polyploids are quite frequent in the plant kingdom (Masterson 1994). It has been proposed that polyploids were selected because of selective advantages over 2X such as an enhanced vigor. Polyploids may be allopolyploids or autopolyploids and may result either from sexual reproduction via 2n gametes or somatic chromosome doubling. It means that allopolyploids inherited subgenomes coming from two different parents after interspecific hybridization. Autopolyploids arise from somatic chromosome doubling, such as most 4X citrus genotypes, and from intraspecific hybridization or self-fertilization through 2n gametes. Subgenomes of autopolyploids are then considered as being identical.

Numerous studies dealing with genetic and epigenetic changes associated with polyploidization were performed on newly created allopolyploid material (*eg*: Song et al. 1995 ; Comai et al. 2000 ; Kashkush et al. 2003 ; Wang et al. 2006 ; Lukens et al. 2006). Recently Ni et al. (2009) proposed that hybrids and allopolyploids gain advantages from the control of circadian-mediated physiological and metabolic pathways, leading to growth vigor and an increased biomass. According to Adams et al. (2003), those changes in gene expression are potentially advantageous in allopolyploids because an increase of heterozygosity may be at the origin of subfunctionalization. After duplication, two gene copies become specialized to perform complementary functions (Ward and Durrett, 2004). Partitioning of functions and/or expression patterns between duplicated genes may occur, and then be regulated in a tissue-specific manner. This may favor the adaptation to environmental changes. As well, expression of homeologous genes in allopolyploids may be regulated by diverged regulatory elements associated with different subgenomes (Stupar et al. 2007).

To date, genome expression changes in allotetraploids are considered to be more affected by genome hybridization than by genome ploidy changes (Auger et al. 2005). Studies aimed to identify changes in the genome expression pattern of autotetraploids are not very numerous (*eg*: Guo et al. 1996; Albertin et al. 2005; 2006; Stupar et al 2007). On the contrary of allotetraploids, alteration of the expression of any allele in autopolyploids may lead to phenotype changes since it is considered that no potential for homologous complementation or advantageous subfunctionalization could occur. Quite recently, Stupar et al (2007) investigated autopolyploid series in potato including one monoploid clone, 2X clones, and one 4X clone. Analysis of the transcriptome using microarrays showed that gene expression changes were very limited, suggesting that autopolyploids derive all of their alleles from a single specie and may experience fewer alterations in their regulatory networks, resulting in fewer gene expression changes (Stupar et al 2007). According to these authors, gene

expression changes observed in between 2X and 4X genotypes could be attributed to nuclear dosage and ploidy-driven cellular modifications leading to physiological changes such as cell size, division rate, or organellar composition.

Allopolyploidization is often accompanied by epigenetic processes such as modification in DNA cytosine methylation and activation of transferable elements (Osborn et al. 2003). Genetic remodeling caused by DNA rearrangements, gene activation, gene silencing and loss of genes were also reported (Osborn et al. 2003, Adams et al. 2005). If the increase in the number of copies of alleles and epigenetic processes in allotetraploids are factors leading to improved plasticity (Osborn et al. 2003), it is expected that citrus allotetraploids may harbor a better tolerance to water deficit than their diploid parents. Allotetraploid wheatgrass was more tolerant to water deficit than diploids (Franck 1980). Plum tree and paper birch allotetraploid, pentaploid and hexaploid ligneous plants were shown to be more tolerant to water deficit than their respective diploid equivalent (Pustovoitova et al. 1996, Li et al. 1996).

Based on seedlings growth and chloride accumulation in leaves under salinity stress, autotetraploid plants of trifoliate orange, Carrizo citrange and Cleopatra mandarin were shown to be more tolerant than their respective diploid parents (Saleh et al. 2008). As well, we found that Cleopatra mandarin autotetraploid plants subjected to salt stress presented a greater growth rate than diploid suggesting that autetraploid genotypes experienced a better adaptation to stress. Polyploid leaves present larger stomata and a decreased stomata density (Byrne et al. 1981, Chen 2007). Leaves of citrus autotetraploid are thicker and have larger mesophyll cell volume (Romero-Aranda et al. 1997). Autotetraploid citrus seedlings were shown to have lower growth rates than their respective diploid parents, associated with a lower rate of whole plant transpiration (Syvertsen et al. 2000).

The tolerance of citrus rootstocks to water deficit has been widely investigated (Levy and Syvertsen 2004). However, studies of genome expression in polyploid plants subjected to stress conditions are just beginning (Liu and Adams 2007). According to these last authors, genes duplicated by polyploidy in ancestral polyploids are preserved in their genomes because their expression has been partitioned in response to environmental stress. In citrus, newly created somatic hybrids and spontaneous autotetraploid genotypes enable global gene expression studies of polyploid genomes immediately after autopolyploidization or allopolyploidization events. We have recently investigated the leaf morphology and anatomy of autotetraploid and allotetraploid seedlings versus its diploid parental. Using microarrays, we also studied the 2X versus 4X leaf genome expression of Rangpur lime seedlings grown in control condition. Our results suggested that even though large morphological and anatomical

differentiations were observed between 2X and 4X genotypes, genome expression changes were very limited. Then, we proposed that gene dosage compensation leading to subtle gene expression changes occurred and may be at the origin of large phenotypical differentiation between 2X and 4X plants (Allario et al., submitted for publication).

Since spontaneous 4X citrus genotypes arise in 2X seedling (Cameron and Soost 1969) and nucellar seedlings from 4X mother tree are almost all of them autotetraploid, citrus represents a very interesting material to investigate the transcriptomes of 4X *versus* 2X genotypes immediately after the autopoloidization event.

Citrus scion varieties are grown on rootstocks to overcome biotic and abiotic problems (Levy and Syvertsen, 2004). Rootstocks determine the water deficit tolerance of citrus trees by affecting growth and water relations. In the field it has been shown that orange grafted on Rangpur lime were tolerant to drought (Pompeu Junior 2005). This fast-growing tree is considered as a cold and water deficit tolerant rootstock but is, unfortunately, also highly sensitive to phytophthora root rot (Carpenter and Furr, 1962). Previously we have measured the water loss of excised leaves harvested from well-irrigated 2X and 4X RL seedlings and concluded that leaf water content was higher in 4X genotypes compared to 2X (Allario et al., submitted for publication). Autotetraploid citrus seedlings were shown to have a lower growth rates, associated with lower rates of whole plant transpiration, than their respective 2X parents (Syvertsen et al. 2000, Allario et al., submitted for publication). However, water deficit tolerance as well as fruit production and quality, of a diploid plant grafted on a 4X rootstock compared to the same variety grafted on 2X rootstock is to date not documented.

In this study, we have investigated the water deficit tolerance of 2X and 4X Rangpur lime rootstocks grafted with Valencia delta sweet orange. Our goal was to verify whether the 4X rootstock may confer better tolerance to water deficit. Moreover, using microarrays, we investigated the transcriptomes of the 2X Valencia delta genotype grafted on both 2X and 4X plants when subjected to water deficit stress. Using qRT-PCR we confirmed the results obtained with microarrays and investigated as well the gene expression in roots in order to find out what would be the molecular determinant at the origin of a greater tolerance to water deficit.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Diploid (2X) seeds of Rangpur lime (*Citrus limonia*, Osbeck ; IVIA 334) were provided by the “Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias” (IVIA) germplasm collection, Spain. At IVIA, a few years ago, an autotetraploid (4X) Rangpur lime tree (IVIA 516) was selected among a population of seedlings from a diploid (2X) original tree (IVIA 334). Autotetraploid (4X) seeds of Rangpur lime, were provided by this tree. Seeds were planted in substrate composed of a mixture of sand, turf and peat, 1:1:1, in a greenhouse for 4 months. The ploidy status of 2X and 4X plants was checked by flow cytometry according to Allario et al (submitted for publication).

A total of thirty 2X and 4X seedlings of each genotype that were uniform were selected and transplanted on the same commercial soil. Potted seedlings were grown in the greenhouse under natural photoperiod conditions, with maximum/minimum air temperatures of 18/16 and 29/24 °C at night and day, respectively, and at a relative humidity between 40 and 85 %. Plants were irrigated with a standard nutrient solution composed of 3 mol m⁻³ Ca(NO₃)₂, 3 mol m⁻³ KNO₃, 2 mol m⁻³ MgSO₄, 2.3 mol m⁻³ H₃PO₄, 17.9 mmol m⁻³ Fe-ethylenediamine dihydroxyphenyl acetic acid and trace elements. One year-old plants were then grafted with Valencia delta sweet orange (*Citrus sinensis*). Trees were then grown in greenhouse for 2 years. Since 4X Rangpur lime rootstocks grafted with valencia delta orange (4X RL/V) were growing slower than 2X Rangpur lime rootstocks grafted with valencia delta orange (2X RL/V), plants were pruned in order to homogenise them. Four months later, twelve homogenous 2X RL/V and ten 4X RL/V were selected in order to investigate their water deficit tolerance.

Water deficit application

Prior to exposition to water deficit, plants were regularly watered at the field capacity for two weeks. Plants pots were then transferred in a plastic bag before being weighed. Afterward, the water requirements to maintain control plants at the field capacity were estimated. The water deficit was applied by stopping the watering of 6 plant combinations of 2X RL/V and 4XRL/V for 24 days after bagging the pots. The experiment was monitored for one month in greenhouse condition from October through November, with day/night temperatures being of 20-35°C/18-20°C respectively.

Leaf stomatal conductance, quantum yield of PSII electron transport (Φ_{PSII}) and pot weight

Three leaves per plant were labeled for stomatal conductance and chlorophyll fluorescence investigations. Leaf stomatal conductance was monitored by using a leaf porometer (SC-1, Decagon Device). Quantum yield of PSII electron transport, $((F'm-Ft)/F'm, \Phi_{PSII})$ was monitored using a leaf fluorometer (Fluorpen FP 100, Qubit systems). Using a balance, pots were regularly weighed along the experiment.

ABA leaf and root contents

ABA concentration was estimated in roots and leaves of 2X RL/V and 4X RL/V trees grown in control conditions. Sampling preparation was performed according to Xiong et al (2001). ABA concentration was determined using the Phytodetect ABA immunoassay kit in root and leaves. To confirm our results, a second analysis was performed independently in leaves of 2X RL/V and 4X RL/V trees using radioactive immunoassay.

RNA extraction and labeling

We investigated gene expression in roots and leaves of control and stressed plants of the different genotypes. Four independent biological leaf samplings were harvested each week. Young secondary root samplings were harvested the last day of the experiment. Samples were stored at minus 80°C and total RNA purification and quality assessment were performed as previously described (Brumós et al. 2009). For microarray hybridization, total RNA was retrotranscribed to cDNA and labelled with the Cy3 and Cy5 fluorophores following the indirect method, as previously described (Forment et al, 2005).

Microarrays hybridization and data analysis

We used the Citrus genome-wide cDNA microarray that includes 21,081 putative unigenes described in Martinez-Godoy et al. (2008). The experimental design consisted of two independent microarray hybridization experiments performed with the 2X Valencia delta scion alternatively grafted onto 2X or 4X Rangpur lime rootstocks. For each experiment, Cy-labelled cDNA of control leaves was hybridized with labelled cDNA from water-stressed samples. To avoid Cy3 and CY5 dye-related artefacts, control and water-stressed cDNA samples were dye-swapped and used to hybridize four slides corresponding to different combinations of the four biological replicates obtained from every treatment. The Microarray hybridizations and the data analysis were performed as described in Allario et al (submitted for publication). Differences in gene expression were considered to be significant when the *P*-value was smaller than 0.05 and the M-value $\geq |0.7|$.

Functional analysis

Gene ontology (GO; Ashburner et al, 2000) term annotation of array features and function-based analysis of microarray results were carried out with Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005).

GO terms for each of the three GO main categories (biological process, molecular function and cellular component) were obtained from sequence similarity using the application default annotation parameters. GO annotations were completed by locally running homology searches specifically through the TAIR Arabidopsis database, appending InterProScan functional results to GO annotation (Quevillon, 2005) and applying the Second Layer Gene Ontology augmentation strategy (Myhre, 2006), all three functionalities available within the Blast2GO software. GO term enrichment analysis of significant differentially expressed genes was performed with the Fisher's Exact Test (Blüthgen *et al.*, 2005) also present in the application.

Real-time reverse transcription-PCR

Genes that were selected from microarrays analysis for qRT-PCR investigations were searched among all sequences in the non-redundant databases using the BLASTN and TBLASTX algorithms and in the citrus EST database (CFGP database, Citrus Functional Genomic project, <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/bioinfo.ibmcp.upv.es>). The primers that were used in real time RT-PCR (Table 1) were defined using the software Oligo Explorer (Gene LinkTM, <http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>) to select primer pairs with lesser risk of primer dimers and hairpins formation.

Quantitative real-time RT-PCR was performed with a LightCycler 2.0 Instrument (Roche) equipped with LightCycler Software version 4.0 according to the procedure previously reported (Colmenero-Flores *et al.*, 2007).

Statistical analysis

Data are expressed by the mean value \pm SE. We used SIGMASTAT from SPSS (Chicago; www.spss.com_software_science) to analyze the data. The *t* test and ANOVA test were used to detect differences between the genotypes and the growing conditions at the usual probability level of $P < 0.05$.

RESULTS

In order to investigate whether 4X RL rootstocks can influence the leaf water content of the scion grafted on it, we have measured here different physiological and water balance parameters of a 2X Valencia delta scion grafted onto 4X RL rootstock (4X RL/V) and its 2X parental (2X RL/V). Leaf surface area and fresh weight were not significantly affected by the ploidy level of the rootstock. Furthermore, weight loss from detached leaves, regularly weighted for 100h, showed that the ploidy status of the rootstock did not alter the relative water content of the scion leaves (data not shown). We additionally measured the leaf stomatal density and size and found no significant difference between 2X RL/V and 4X RL/V plants (data not shown). Interestingly, under control irrigation conditions, leaves of Valencia delta grafted on the 4X rootstock presented a lower stomatal conductance (g_s) compared to leaves of the same scion grafted on the 2X rootstock (Fig. 1A). The mean leaf g_s values of 2X RL/V and 4X RL/V trees were respectively 126.74 and 93.97 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

When two groups of 2X RL/V and 4X RL/V plants were no longer watered during 12 days, they exhibited a decrease of g_s values. Both 2X RL/V and 4X RL/V plants reached similar leaf g_s values the 16th day and, afterwards, reached a plateau the 18th day. Later, the 29th day, g_s continued to decrease down to a value of less than 20 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 2X RL/V but not for 4X RL/V (Fig. 1A). We also measured the Φ_{PSII} along the experiment (Fig. 1B). For stressed plants, Φ_{PSII} dropped later than g_s , 2X RL/V combinations trees being more affected by the stress (Fig. 1C). Since plant pots were bagged and water loss mainly occurred throughout the transpiration stream, and pot weight decreased progressively and quite slowly. From the beginning of the stress to the 16th day, pot water loss decreased much faster than the following days. Along the stress, 2X RL/V combinations presented a clearly faster decrease of pots weight than 4X RL/V. Since pots were bagged, the stress was very progressive and 2X RL/V leaves did not seem more wilted. In control condition the leaf and root ABA contents of 2X RL/V and 4X RL/V combinations were monitored. Results showed that 4X RL/V presented twice more ABA content of 2X RL/V genotypes in leaves (Fig 2A) and five fold more in roots (Fig 2B).

Leaf samplings were harvested regularly along the stress experiment. We chose to investigate gene expression the last day of the experiment since 2X RL/V genotypes experienced a much stronger stress phenotype for water loss and stomatal conductance compared to 4X RL/V. Gene expression changes induced by water deficit were monitored in leaves of 2X RL/V and 4X RL/V plants by microarray hybridization. Only information from microarrays with optimal hybridization data were pre-processed and normalized for further analyses (see

methods). Probes showing significant differential expression during the treatment were identified using the R-package Limma (Linear Models for Microarray Data) tool (Smyth, 2005). While 904 genes were differentially expressed by water deficit in leaves of the scion grafted onto the diploid rootstock, only 345 genes were differentially expressed in leaves grafted onto the tetraploid rootstock (supplemental Table S2). Functional classification of genes was performed using Blast2GO (B2G), a research tool designed to enable Gene Ontology (GO) based data mining (Conesa et al, 2005). Lists of differentially expressed genes together with their respective GO annotations are given in supplemental Table S1 and S2 for 2X RL/V and 4X RL/V plants respectively. Out of 345 genes differentially expressed in 4X RL/V plants, 218 were also differentially expressed in 2X RL/V plants. This sub-group of common genes exhibited similar expression patterns in response to water deficit (Supplemental Fig S1). The only exception was C08004G06, the top-repressed gene in 2X RL/V plants, which was significantly induced in 4X RL/V plants (Supplemental Fig S1). The *Arabidopsis* orthologue of C08004G06 is At1g12200, which encodes for an enzyme of unknown biological function belonging to the flavin-containing monooxygenase (FMO) family that, according to the GENEVESTIGATOR database, is highly expressed in cork, xylem and seed-coat tissues.

Functional categories significantly enriched in the groups of water deficit-induced and repressed genes were additionally identified through Fisher's exact test with Multiple Testing Correction. To develop this analysis, the B2G software was employed because it allows the use of the *Citrus* microarray as the reference gene-set instead of the *Arabidopsis* genome (Conesa et al, 2005). Significantly enriched functional categories induced by water deficit are similar in both 2X RL/V and 4X RL/V plants (supplemental Table S3a and S3b). Most abundant categories are related with abiotic stress responses, including ABA and water deprivation. Although the number of induced genes present in these categories is more abundant in 2X RL/V plants (Fig. 3A), its relative abundance, related to the total number of induced genes, is similar if not higher in 4X RL/V plants (Fig. 3B). A different scenario is found in the group of genes repressed by water deficit. Valencia grafted on 2X rootstocks, but not on 4X rootstocks, abundantly repressed genes related to photosynthesis and carbon fixation (Supplemental Tables S3 and S4). Other functional categories related to starch biosynthesis and protease inhibitor activities were equally repressed in both systems (supplemental Table S4).

From microarrays analyses, we selected genes that were up and down regulated by stress (8 down and 11 up regulated) in order to confirm microarray data by qRT-PCR. All of the

selected genes belonged to photosynthesis, detoxication, cell wall and cuticle biosynthesis, osmoticum biosynthesis processes and are presented with their associated functions in Table 1. Also, we investigated a candidate gene (*NCEDI*) involved in ABA biosynthesis. Quantitative data were normalized and the resulting expression values were correlated with the microarray expression log (2) ratios. qRT-PCR analysis in leaf clearly confirmed the down and up regulation observed with microarrays (Fig.4A). Interestingly the gene expression ratios of stressed leaves over control leaves were not significantly changed regardless of the rootstock's ploidy status. Gene expression analysis was also performed in roots with the same gene set. Genes involved in photosynthesis and cuticle biosynthesis were, as expected, very little expressed in 2X and 4X roots were not presented. As for the genes that were shown to be down regulated by stress in Valencia orange leaves, most of them were not significantly changed and genes that were shown to be up regulated by stress in Valencia leaves were shown to be up regulated. Notably, the 2X RL genotype presented a more pronounced up regulation of all the tested genes in root than the 4X RL genotype. As well the *NCEDI* candidate gene, which was not significantly up or down regulated by stress in leaves of 2X and 4X RL/V on the microarrays data set, was shown to be slightly up regulated using RT-qPCR. However, in stress conditions, the up regulation in 2X roots was more evident with a clearer over expression. We crossed the data in order to investigate the gene expression ratio of 4X over 2X in control and stress conditions for leaf and root samples for the same gene set. In control conditions, the gene expression ratios of tetraploid over diploid for leaf samples were less than 1.5 for all the genes (data not presented on Fig. 4C). Interestingly, the analysis of the gene expression ratios of the same genes in roots showed a dramatic up regulation for all genes, including *NCEDI* in tetraploid genotypes (Fig. 4C). In stress condition the same analysis was also performed in leaf and root with the same gene set (Fig. 4D). Comparison of the tetraploid and diploid's gene expression ratios in stressed leaves did not revealed large changes of expression since the ratios of tetraploid over diploid for leaf samples were less than 1.5 for all the genes (data not presented on Fig. 4D). In stressed roots, genes were more expressed in 4X than in 2X but ratios were smaller than for control condition.

DISCUSSION

In a recent study, we investigated gene expression in 2X and 4X leaves of Rangpur Lime genotypes grown in control condition aiming to put in evidence what were the molecular determinants of the phenotypical differentiation (Allario et al., submitted for publication). In this last work we proposed that larger cell size, larger leaf water content and the thicker cuticle and lower leaf stomatal conductance observed in 4X genotypes may contribute to a better adaptation of tetraploids to stress constraints. In the present study we investigated the water deficit tolerance of 2X and 4X RL genotypes grafted with Valencia delta sweet orange aiming to determine if polyploid rootstock may be at the origin of greater water deficit tolerance. As well, gene expression was monitored using microarrays in leaves of 2X RL/V and 4X RL/V respectively in control and water deficit conditions. The goal of this gene expression investigation in the clonal 2X orange variety was to characterize the impact of the use of a 4X rootstock compared to a 2X rootstock on gene expression in leaves without any interference of leaf polyploidy status. Then, selected genes that were shown to be up and down regulated by stress in leaves were investigated using RT-qPCR to confirm results of microarrays. We also analyzed the gene expression in 2X and 4X roots of genotypes grown in control and water deficit conditions using the same gene set.

Investigation of the leaf morphological and anatomical phenotype (leaf area, leaf thickness, stomatal density and size) of Valencia orange grafted on 2X and 4X RL rootstocks grown in control conditions did not show any significant difference. However, we observed that the stomatal conductance of 4X RL/V leaves was much lower than of 2X RL/V leaves. This in agreement with previous studies performed in polyploids showing 4X genotypes present lower rates of whole plant transpiration associated to a lower growth rate (Romero-Aranda et al. 1997, Allario et al. submitted for publication). Before they were pruned in order to get homogenous plants, 2X RL/V were taller compared to 4X RL/V. So, we may consider 1) that the increase of the stomata size associated to the decrease of the stomata density is not the only physiological criteria at the origin of the lower g_s values in 4X RL seedlings and 2) that the lower g_s values and lower growth rate we observed using 4X rootstocks may have its origin in the root system. Many investigations have shown that roots can sense the soil's moisture status resulting of the translocation from root to shoot of a chemical signal without inducing any detectable changes in shoot/water relation (Blackman and Davis, 1985; Gutchick and Simonneau, 2002). ABA is the main chemical signal in the root/shoot communication (Tardieu and Davis, 1993; Dodd 2003). Afterward, we quantified the root and leaf ABA content in 2X RL/V and 4X RL/V grown in control condition in order to verify if

those hormones may be a the origin of the difference in g_s values previously measured. Our results clearly demonstrated that 4X RL/V presented a greater amount of ABA than 2X RL/V in leaves but also in roots. Since control plants were watered at the field capacity in order not to generate any water deficit, we may expect that the greater ABA measured in leaves of 4X RL/V was originating from roots and was translocated in the leaves through the transpiration stream. Consecutively, this higher leaf ABA content probably contributed to the regulation of the stomatal conductance in 4X genotypes minimizing tree's water loss and decreasing its growth rate (Xiong et al. 2006).

Homogenous 2X RL/V and 4X RL/V trees were subjected to a progressive water deficit. Investigation of g_s showed that stomata closure seemed to have occurred in the meantime for both genotypes suggesting that the sensing of the water deficit in roots occurred at the same time, probably in between the d-12th and d-16th days. From d-16th to d-28th, g_s values were not significantly different between 2X and 4X genotypes suggesting that trees were experiencing the same water loss through the transpiration stream. However, from the beginning of the stress until d-16th, 2X RL/V plants lost more water through the transpiration stream than 4X RL/V according to g_s values that were much higher. This was confirmed by a decrease of weight of the pots from d-9th to d-18th, which was faster in 2X RL/V compared to 4X RL/V. After d-18th until d-28th the difference of soil humidity and pot water loss stayed similar between 2X RL/V and 4X RL/V probably because the plants were losing the same amount of water through the leaves even though stomata were mostly closed (g_s circa 25 mmol.m⁻².s⁻¹). Interestingly, from d-28th to the last day of the stress 4X RL/V maintained a constant value of g_s , 2X RL/V presenting values that were close to 15 mmol.m⁻².s⁻¹. In the same experiment, investigation of chlorophyll fluorescence has shown that Φ_{PSII} decreased much faster in 2X RL/V than 4X RL/V showing that 2X RL/V were more stressed. Φ_{PSII} began decreasing for both genotypes between d-16th and d-21st. Then, we may suppose that this drop of Φ_{PSII} was the result of the stomata closing.

In 1980, Franck investigated water deficit tolerance of wheatgrass polyploid. According to this author who studied the photosynthesis activity in control and water deficit conditions, hexaploid and tetraploid presented greater traits of tolerance associated to higher capacity of fixing CO₂.

Xiong et al. (2006) shown that hexaploid wheat lines were more tolerant to water deficit than tetraploids, those last genotypes being more tolerant than the diploid ones. When subjected to a progressive water deficit, hexaploids of wheat were shown to decrease their stomata conductance prior to tetraploids and to diploids. Then, the studied polyploids were able to

maintain a constant leaf relative water content longer than diploid suggesting that polyploids experienced a hydraulic root signal preferentially to an ABA signaling (Blackman and Davis, 1985 ; Xiong et al., 2006). To our knowledge, this work is the first one trying to discriminate the impact of a 4X root system on the physiology of a rootstock / scion association when subjected to a water deficit. Indeed, by using a 2X scion, we avoided the greater stomatal size and lower stomatal density observed in 4X seedlings. Then, we investigated leaf and root gene expression on 2X RL/V and 4X RL/V grown in control and stress conditions in order to identify the molecular determinant of that water deficit tolerance of 4X genotypes.

Leaf samplings were performed along the experiment in order to investigate gene expression using microarrays. The larger phenotypical differentiation due to the stress was observed at the end of the experiment. So, we used this date in order to investigate genes expression.

The analyze of the gene expression was performed in leaf of 2X RL/V and 4X RL/V grown in stress condition for 31 days.

Since the number of genes differentially expressed by water deficit in leaves of 2X RL/V was three fold greater than in 4X RL/V, we may consider that associations on 2X rootstocks were more stressed than associations on 4X rootstocks. However, 63% of the genes differentially expressed in leaf of 4X RL/V plants were also differentially expressed in 2X RL/V plants suggesting. The most abundant categories were related with abiotic stress responses, including ABA and water deprivation indicating that the responses to abiotic stress and ABA stimulus were equally activated in both diploid and tetraploid plants. Genes related to photosynthesis and carbon fixation were highly repressed in 2X RL/V compared to 4X RL/V. Inhibition of photosynthetic metabolism at the transcriptional level is known to be a general response of herbaceous (Khelil et al, 2007; Sahi et al, 2003; Seki et al, 2002; Ozturk et al, 2002; Kawasaki et al, 2001) and woody plants like Citrus (Brumos et al, 2009; Gimeno et al, 2009) to water deficit and osmotic stress. The absence of this response in 4X RL/V plants shows a radical difference with 2X RL/V plants in the perception of the stress and support the idea that water deficit is more efficiently avoided in Citrus plants containing the tetraploid rootstock.

Then, we selected 10 and 11 genes that we have shown to be respectively down and up regulated by the stress in order to confirm microarray data by qRT-PCR. All the genes we studied by qRT-PCR clearly confirmed microarray results. Gene expression ratio of stressed leaves over control leaves was not significantly changed whatever the ploidy status of the rootstock excepted for *HVA22*, *AOX*, *CCR*, *DH*, *P5CS*, *GaLS*, *LEA*, and *RS* that were more expressed in diploids. Taking account of the fact that 2X RL/V were more stressed than 4X

RL/V, this may not be surprising. As expected, investigation of the expression of those same genes in roots confirmed a greater over expression in 2X RL/V compared to 4X RL/V confirming that plants grown on 2X rootstocks were more stressed.

qRT-PCR analyzing in leaves did reveal very limited change in gene expression between 2X RL/V and 4X RL/V grown in control condition suggesting that the use of at 2X or a 4X rootstock did not affect the Valencia leaf gene expression. In the present study, the same variety was grafted on 2X and 4X rootstocks, and then it was not surprising that croarray and (Fig. 6A). However, in control condition, analyzing of the gene expression using qRT-PCR in roots shown a dramatic up regulation of all the studied genes suggesting that 4X rootstock perform as a diploid citrus plants under water shortage as we proposed previously (Allario et al, submitted for publication). Interestingly, *NCED1* that was chosen as a candidate gene since it was shown to be up regulated in water stress condition and promoted ABA biosynthesis (Rodrigo et al., 2006). In control condition, the 4X RL/V over 2X RL/V ratio of expression in leaf was close to zero suggestion that leaves of control plants were not stressed and no ABA was synthesized in leaf. However in roots, a dramatic up regulation of *NCED1* was observed in 4X compared to 2X rgenotypes. This high expression of *NCED1* is in agreement with the greater ABA content we measured in roots and leaves. In stress condition, leaf gene expression of 4X RL/V was similar to 2X RL/V since the absolute values of the ratios for all the genes were minor to 1 except for 3 genes (ratio minor to 2), (Fig. 6B). However, also in stress condition, an over expression was still observed in root of 4X RL/V compared to 2X RL/V for all the genes except 2 suggesting that that the gene up regulation experienced in control condition was still marked when plants were stressed.

Taking together, our results suggest that 4X RL rootstock constitutively synthesize more osmoticum and ABA than in 2X RL rootstocks even plants are not stressed. This ABA is translocated to the leaves throughout the transpiration stream and will lead to a reduction of gas exchanges. Those regulations will lead to a lower growth rate of the plants. In stress condition the perception of the stress will occur in the same time for 2X and 4X rootstocks leading to the closure of the stomata to limit water exchanges. However, since plants grown on 4X genotypes presented a more limited transpiration before the stress, a more limited water loss will occur in plant grown on 4X making them more tolerant to water deficit.

FUNDINGS

Funding for Thierry Allario and for the work performed was provided by INCO UE project 015453. Additional funding come from an AGL2007-65437-C04-01 grant from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Angel Boix for technical assistance.

REFERENCES

- Adams, K.L., Cronn, R., Percifield R. and Wendel, J. F. (2003) Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4649–4654.
- Adams, K.L. and Wendel, J.F. (2005) Allele-specific, bi-directional silencing of an alcohol dehydrogenase gene in different organs of interspecific diploid cotton hybrids. *Genetics* 171, 2139-2142.
- Albertin, W., Brabant, P., Catrice, O., Eber, F., Jenczewski, E., Chèvre, A-M. and Thiellement H. (2005) Autopolyploidy in cabbage (*Brassica Oleracea* L.) does not alter significantly the proteome of green tissues. *Proteomics* 5, 2131-2139.
- Allario, T., Brumos, J., Colmenero-Flores, JM., Tadeo, F., Talon, M., Navarro, L., Ollitrault, P., and Morillon, R. Large morphological and anatomical differences between diploid and autotetraploid Rangpur Lime (*Citrus limonia*) are associated with limited changes in leaf gene expression. Submitted for publication.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butle,r H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harri,s M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M. and Sherlock G. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology, pp. 25-29.
- Auger D.L., Gray A.D., Ream T.S., Kato A., Coe E.H. Jr and Birchler J.A. (2005) Nonadditive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize. *Genetics* 169, 389–397.
- Blackman, PG and Davies WJ. (1985). Root to shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. *J. Exp. Bot.* 36: 39±48.
- Blüthgen, N., Kielbasa, S.M. and Herzel, H. (2005) Inferring combinatorial regulation of transcription in silico. *Nucl. Acids Res.*, 33, 272-279.
- Brumós, J., Colmenero-Flores, J., Conesa, A., Izquierdo, P., Sánchez, G., Iglesias, D., López-Climent, M., Gómez-Cadenas, A. and Talón M. (2009) Membrane transporters and carbon metabolism implicated in chloride homeostasis differentiate salt stress responses in tolerant and sensitive Citrus rootstocks. *Functional and Integrative Genomics*, 9, 293-309.
- Byrne, M.C., Nelson, C.J., and Randall, D.D. (1981) Ploidy effects on anatomy and gaz exchanges of tall fescue leaves. *Plant Physiol.* 68: 891-893.
- Carpenter, J.B., and Furr J.R. (1962) Evaluation of tolerance to root rot caused by *Phytophthora parasitica* in seedlings of *Citrus* and related genera. *Physiopathology* 52, 1277-85.
- Cameron, J.W., and Soost, R.K. (1969) Characters of new populations of Citrus polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny, in: *H.D. Chapman (Eds.), Proc. Int. Citric. Symp.*, University of California at Riverside 1, 199–205.

- Colmenero-Flores, JM, Martinez, G., Gamba, G., Vazquez, N., Iglesias DJ., Brumos, J., and Talon M (2007) Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant J.* 50, 278–292.
- Comai, L., Tyagi, A.P., Winter, K., Holmes-Davis, R., Reynolds, S.H., Stevens Y., and Byers, B. (2000) Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed arabidopsis allotetraploids. *Plant Cell.* 12, 1551–68.
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., and Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21, 3674–3676.
- Chen, Z.J. (2007) Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Ann. Rev. Plant Biol.* 58, 377–406.
- Dodd, I.C. (2003). Hormonal interactions and stomatal responses. *J. Plant Growth Regul.* 22, 32–46.
- Forment, J, Gadea, J, Huerta L, Abizanda L, Agusti J, Alamar S, Alos E, Andres F, Arribas R, Beltran JP, Berbel A, Blazquez MA, Brumos J, Canas LA, Cercos M, Colmenero-Flores JM, Conesa A, Estables B, Gandia M, Garcia-Martinez JL, Gimeno J, Gisbert A, Gomez G, Gonzalez-Candelas L, Granell A, Guerri J, Lafuente MT, Madueño F, Marcos JF, Marques MC, Martinez F, Martinez-Godoy MA, Miralles S, Moreno P, Navarro L, Pallas V, Perez-Amador MA, Perez-Valle J, Pons C, Rodrigo I, Rodriguez PL, Royo C, Serrano R, Soler G, Tadeo F, Talon M, Terol J, Trenor M, Vaello L, Vicente O, Vidal C, Zacarias L and Conejero V (2005) Development of a Citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Mol. Biol.* 57, 375–391.
- Gimeno J., Gadea J., Forment J., Pérez-Valle J., Santiago J., Martínez-Godoy M., Yenush L., Bellés J., Brumós J., Colmenero-Flores J., Talón M. and Serrano R. (2009) Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant Mol. Biol.*, 70, 403–420.
- Guo, M., D. Davis and J. A. Birchler, 1996 Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* 142, 1349–1355.
- Gutschick, V.P., and Simonneau, T., (2002) Modelling stomatal conductance of field-grown sunflower under varying soil water content and leaf environment: comparison of three models of stomatal response to leaf environment and coupling with an abscisic acid-based model of stomatal response to soil drying. *Plant Cell Environ.* 25, 1423–1434.
- Kashkush, K. Feldman, M. and Levy, A. (2003) Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics.* 33, 102–106.
- Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D. and Bohnert H.J. (2001) Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. *Plant Cell*, 13, 889–906.
- Khelil A., Menu T. and Ricard B. (2007) Adaptive response to salt involving carbohydrate metabolism in leaves of a salt-sensitive tomato cultivar. *Plant Physiol. Biochem.*, 45, 551–559

- Levy, Y. and Syvertsen, J.P. (2004) Irrigation water quality and salinity effects in citrus trees. In: J. Janick (ed.). *Hort. Reviews.* 30, 37-82.
- Li, W.L. Berlyn, G.P. and Ashton, M.S. (1996) Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *Betula papyrifera* (Betulaceae). *Am. J. Bot.* 83,15-20.
- Liu, Z.L. and Adams, K.L. (2007). Expression partitioning between genes duplicated by polyploidy under abiotic stress and during organ development. *Current Biology.* 17, 1669–1674.
- Lukens L.N., Pires J.C., Leon E., Vogelzang R., Oslach L. and Osborn T. (2006) Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Plant Physiol.* 140, 336-348.
- Masterson, J., (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of Angiosperms. *Science* 264, 421–424.
- Martinez-Godoy M.A., Mauri N., Juarez J., Marques M.C., Santiago J., Forment J. and Gadea J. (2008) A genome-wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis. *BMC Genomics*, 9, 11.
- Myhre S., Tveit H., Mollestad T. and Laegreid A. (2006) Additional Gene Ontology structure for improved biological reasoning. *Bioinformatics*, 22, 2020-2027.
- Ni Z., Kim E-D, Ha M., Lackey E., Liu J., Zhang Y., Sun Q., and Chen Z. J. (2009) Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* 457, 327-333.
- Osborn, T.C. Pires, J.C. Birchler, J.A. Auger, D.L. Chen, Z.J. Lee, H.S. Comai, L. Madlung, A. Doerge, R.W. Colot, V. and Martienssen, R.A. (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* 19, 141–147.
- Ozturk Z.N., Talamé V., Deyholos M., Michalowski C.B., Galbraith D.W., Gozukirmizi N., Tuberosa R. and Bohnert H.J. (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol. Biol.*, 48, 551-573.
- Pompeu Junior J (2005) Porta-enxertos. In: Matos Junior D, De Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J (eds) Citros. Instituto Agrono^omico and Fundag, Campinas, pp 63–104.
- Pustovoitova, T.N. Eremin, G.V. Rassvetaeva, E.G. Zhdanova, N.E. and Zholkevich, V.N. (1996) Drought resistance, recovery capacity, and phytohormone content in polyploid plum leaves. *Russian J. Plant Phys.* 43, 232-235.
- Quevillon E., Silventoinen V., Pillai S., Harte N., Mulder N., Apweiler R. and Lopez R. (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucl. Acids Res.*, 33, 116-120.
- Rodrigo MJ, Alquezar B, and Zacarias L. (2006) Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and

- under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J. Exp. Bot.* 57, 633–643.
- Romero-Aranda, R. Bondada R, Syvertsen, J.P. and Grosser, J.W. (1997) Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autotetraploid citrus. *Ann. of Bot.* 79, 153-160.
- Sahi, Sahi C., Agarwal, Agarwal M., Reddy, Reddy M., Sopory, Sopory S., Grover and Grover A. (2003) Isolation and expression analysis of salt stress-associated ESTs from contrasting rice cultivars using a PCR-based subtraction method. *TAG*, 106, 620-628.
- Saleh, B. Allario, T. Dambier, D. Ollitrault, P. and Morillon, R. (2008) Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *C. R. Biol.* 331,703-710.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y. and Shinozaki K. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.*, 31, 279-292.
- Smyth GK (2005) limma: Linear Models for Microarray Data. In: Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, DuBois S (eds) Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. Springer Berlin Heidelberg New York, pp. 397-420.
- Song, K., P. Lu, K. Tang and T. C. Osborn, (1995) Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7719-7723.
- Stupar RM, Bhaskar PB, Yandell BS, Rensink WA, Hart AL, Ouyang S, Veilleux RE, Busse JS, Erhardt RJ, Buell CR and Jiang J. (2007) Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* 176, 2055-67.
- Syvertsen, J.P. Lee, L.S. and Grosser, J.W. (2000) Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO₂. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 125: 228-234.
- Tardieu F. and Davies W.J. (1993) Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. *Plant, Cell Env.*, 16, 341-349.
- Wang, J. Tian, L. Lee, H-S Wei, N. Jiang, H. Watson, B. Madlung, A. Osborn, T. Doerge, R. D. Comai, L. and Chen, Z.J. (2006) Genome-wide Non-additive Gene Regulation in Arabidopsis Allotetraploids. *Genetics*. 172, 507-517.
- Ward R. and Durrett R. (2004) Subfunctionalization: How often does it occur? How long does it take? *Theor. Pop. Biol.* 66, 93-100.
- Xiong L., Ishitani M., Lee H. and Zhu J.K. (2001) The Arabidopsis *LOS5/ABA3* Locus Encodes a Molybdenum Cofactor Sulfurase and Modulates Cold Stress and Osmotic Stress-Responsive Gene Expression. *Plant Cell*, 13, 2063–2083.

Xiong Y-C, F-M. Li AND T. Zhang. (2006). Performance of wheat crops with different chromosome ploidy : root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. *Planta*. 224, 710-718.

Table captions

Table 1. Gene accession number and function and primers used of the selected genes to confirm by RT-qPCR results of expression obtain through microarray. The rate of expression corresponds to the gene expression in stress condition over control condition from Valencia leaf samplings of 2X RL/V and 4XRL/V. Annealing temperature was 55 °C.

Gene name	Accession number	Function of the gene or the encoded protein	Primer sequence (5'→3')
Repressed genes			
Carbonic anhydrase (CA)	C01015D11	Carbonic anhydrases form a family of enzymes that catalyze the rapid conversion of carbon dioxide to bicarbonate and protons and favor photosynthesis	F: CACCAGCTCCTATCATCAAC R: GCAACAGGTTTCAAGTCTTC
Chloroplast oxygen-evolving enhancer protein (OEE)	C31604E09	Oxygen evolving enhancer protein are auxiliary component of the photosystem II manganese cluster	F: CTCAGGTTCTTTGTTCAAG R: TGGCTCATCAGAGTTCAAC
Phosphoenolpyruvate carboxylase 2 (PEPC)	C16013C03	Phosphoenolpyruvate carboxylase are key enzymes of photosynthesis by catalyzing the addition of CO₂ to phosphoenolpyruvate to form the four-carbon compound oxaloacetate	F: CCAAGCCTACACTCTGAAG R: TAGGGTTAAGCCTCACAAG
Photosystem II reaction center W protein chloroplast precursor (<i>psbW</i>)	C31604G05	Subunit of the photosystem II	F: CTGTTGGGTGTTTTGGTC R: TGGGTTTGGCTTTAGACTTC
CuZn superoxide dismutase (<i>SOD</i>)	C31504C12	CuZn superoxide dismutases are mostly involved ROS detoxication	F: GGAAGTGTTCCTTTAGCG R: TGCCTATGTTCCGTAAGTG
Dehydroascorbate reductase (<i>DHAR</i>)	C31402E11	Dehydroascorbate reductase allow the maintaining of an appropriate level of ascorbate in plant cells which protect against oxidant injury	F: AGCCCAGAAGGGAAAGTACC R: AGGCAAATTCAGGAGGATTG
Glutathione S-transferase GST 22 (<i>GST</i>)	C07010G07	Glutathione S-transferase catalyse the conjugation of reduced glutathione and favour detoxication of endogenous compounds such as peroxidised lipids	F: AATCGCGAGCTATCATAAGG R: CTAAGTCCAGCCATTGTCC
Putative fatty acid elongase (<i>FAE</i>)	C32009D10	Fatty acid elongase would be involved in bilayer making as well as in the wax of the cuticle	F: GGGGCTTGAAGAATACAGG R: AATGCCTCAGCTAAAGAAGG
Over expressed genes			
Chlorophyllide A oxygenase chloroplast precursor (<i>CAO</i>)	C31601G07	Chlorophyllide A oxygenase chloroplast precursor are enzyme involved in b chlorophyll biosynthesis	F: TACCTATGGAGGCACTTTG R: CACCCCTAGTTTGTGCTAAC
Alternative oxidase mitochondrial precursor (<i>AOX</i>)	KN0AAP7YK07	Alternative oxidase are enzymes that provide an alternative route for electrons passing through the electron transport chain to reduce oxygen and enhance an organisms' ability to resist stresses, through reducing the level of oxidative stress	F: GCGTAAGTTCCAGCATAGTG R: CCTCCAAGTAGCCAACAAC
Cinnamoyl-CoA reductase-like protein (<i>CCR</i>)	C34205C03	Cinnamoyl-CoA reductase are enzyme that catalyse the first step of biosynthesis of monoterpenes of lignin	F: CCTTGCAAAGACATATCTG R: GATTGAGGGTTCTGTTGAG
Cuticle protein (WAX2)	C02002B06	Compound of the cuticle on the leaf epidermis that allows to limit leaf water loss and limit irradiation caused by the sun	F: CTCGATGGAACACAAAAGG R: AGTGGTAATGGGTGAAAAGG
Putative <i>HVA22</i> gene	C31106H02	<i>HVA22</i> gene was shown to be induced by environmental stresses, such as dehydration, salinity, and extreme temperatures, and by a plant stress hormone, abscisic acid	F: TGGCAAGGGCAAGAACAAG R: ACAAGCCAACGGAGAATCG
Dehydrin (<i>DH</i>)	C31207C07	Dehydrins are thermostable hydrophilic protein that play a major role of osmoprotectant and stabilise proteins in stress condition	F: GCCACCGAGTTTGAGAAAG R: GTGGATCGGTGAAGTTTGTC
Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (<i>P5CS</i>)	C34107H03	Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase allows converting of glutamat to Delta1 -pyrroline-5-carboxylate to proline that is involved in osmotic stress tolerance	F: CTAGGAAAGCACCATACGAG R: GAGGCCCTCTACATCACTC
Early-responsive to dehydration protein (<i>ERD4</i>)	C01019H06	Early-responsive to dehydration protein were shown to be synthesised in water deficit condition and would favour protein stabilisation	F: CGTGCCCTGTCTACTGTAC R: CCATGTAGGGGTTTCCTTC
Galactinol synthase (<i>GoLS</i>)	C31402D06	Galactinol synthase catalyses the first step of the biosynthesis of raffinose family oligosaccharides which are osmoprotectant against water deficit	F: CCATGGCCTATTATGTCATC R: CATCAGGCAAGTCAACAG
Group I late embryogenesis abundant protein (<i>LEA</i>)	C34209G11	Group I late embryogenesis abundant proteins were shon to synthesised in water deficit condition and would favour protein stabilisation	F: GCGACGGAGAAGAAAGAGG R: CACCACCCCTCAATCACC
Raffinose synthase (<i>RS</i>)	C05076C10	Raffinose synthase enzyme allows the biosynthesis of the raffinose known to be an osmoprotectant when plant are subjected to water deficit	F: TCGACGTTATCCATTGCTG R: CACCATTGCCCTTGAAGTG

Supplemental Table S3a: Significantly enriched functional categories in the group of genes induced by water deficit in 2XRL/V and 4XRL/V plants. The relative abundance of GO functional categories is analyzed in relation to their presence in the microarray (Conesa et al, 2005). Significantly enriched functional categories are given ($P < 0.05$ after Fisher's exact test for each GO term). NS, not significantly enriched GO category.

GO Term	Name	2X		4X	
		FDR corrected <i>P</i> -value	N ^{er} Genes	FDR corrected <i>P</i> -value	N ^{er} Genes
GO:0009651	response to salt stress	2.11E-08	23	4.05E-06	12
GO:0009737	response to abscisic acid stimulus	2.11E-08	27	2.65E-08	16
GO:0009415	response to water	2.11E-08	24	2.65E-08	14
GO:0009628	response to abiotic stimulus	2.11E-08	61	2.65E-08	29
GO:0006950	response to stress	2.67E-08	63	8.70E-05	26
GO:0006970	response to osmotic stress	3.56E-08	25	2.59E-05	12
GO:0009414	response to water deprivation	4.49E-09	18	3.58E-05	9
GO:0009409	response to cold	1.76E-07	19	4.05E-06	11
GO:0008378	galactosyltransferase activity	4.07E-07	10	3.36E-05	6
GO:0050896	response to stimulus	5.04E-07	94	5.99E-04	37
GO:0009266	response to temperature stimulus	2.44E-06	24	1.74E-04	12
GO:0047274	galactinol-sucrose galactosyltransferase activity	1.49E-05	5	0.0013381	3
GO:0009312	oligosaccharide biosynthetic process	3.13E-05	4	NS	
GO:0047268	galactinol-raffinose galactosyltransferase activity	3.13E-05	4	NS	
GO:0042538	hyperosmotic salinity response	2.00E-04	8	4.05E-06	7
GO:0009725	response to hormone stimulus	5.21E-04	29	2.32E-04	16
GO:0006972	hyperosmotic response	6.20E-04	8	1.05E-05	7
GO:0000272	polysaccharide catabolic process	0.0013645	8	NS	
GO:0016758	transferase activity, transferring hexosyl groups	0.0021375	17	NS	
GO:0047216	inositol 3- α - galactosyltransferase activity	0.003928	3	2.30E-04	3
GO:0009269	response to desiccation	0.0052258	5	0.0013381	4
GO:0016757	transferase activity, transferring glycosyl groups	0.0052258	20	NS	

Supplemental Table S3b: Significantly enriched functional categories in the group of genes induced by water deficit in 2XRL/V and 4XRL/V plants. The relative abundance of GO functional categories is analyzed in relation to their presence in the microarray (Conesa et al, 2005). Significantly enriched functional categories are given ($P < 0.05$ after Fisher's exact test for each GO term). NS, not significantly enriched GO category.

GO Term	Name	2X		4X	
		FDR corrected <i>P</i> -value	N ^{er} Genes	FDR corrected <i>P</i> -value	N ^{er} Genes
GO:0001509	legumain activity	0.0079905	3	NS	
GO:0009719	response to endogenous stimulus	0.0096682	36	0.0186408	17
GO:0042221	response to chemical stimulus	0.0113269	45	0.0173187	21
GO:0044247	cellular polysaccharide catabolic process	0.0162428	6	NS	
GO:0016023	cytoplasmic membrane-bound vesicle	0.0162428	73	NS	
GO:0016696	oxidoreductase activity, acting on hydrogen as donor, NAD or NADP as acceptor	0.0370324	2	NS	
GO:0010277	chlorophyllide a oxygenase activity	0.0370324	2	NS	
GO:0006075	1,3-beta-glucan biosynthetic process	0.038121	3	NS	
GO:0000148	1,3-beta-glucan synthase complex	0.038121	3	NS	
GO:0051278	chitin- and beta-glucan-containing cell wall polysaccharide biosynthetic process	0.0470911	3	NS	
GO:0009642	response to light intensity	0.0475141	7	NS	
GO:0016160	amylase activity	0.0483313	4	0.0352427	3

Figure captions

Figure 1: A) Leaf stomatal conductance (g_s) of 2X RL/V and 4X RL/V grown in control condition and subjected to a water deficit for 31 days. B) Quantum yield of PSII [$(F'_m - F_t)/F'_m$] measured for the same genotypes grown in the same conditions for the same duration. C) Relative Pots water loss measured for 2X RL/V and 4X RL/V grown in control condition and subjected to a water deficit for 31 days. (●: 2X RL/V, control condition ; ○: 2X RL/V, stress condition ; ▼: 4X RL/V, control condition ; ▽: 4X RL/V, stress condition). Vertical bars indicate the mean value \pm SE.

Figure 2: Light microscopy from leaf cross-section (leaf central nerve: A and B, petiole: C and D and foliar limb: E and F). Left panels correspond to 2X, right panels correspond to 4X.

Figure 3: Functional categories of induced genes between Valencia sweet orange grafted on RL4X and Valencia sweet orange grafted on RL2X.

Figure 4: A) Gene expression in leaves from Valencia scion grafted on 2X and 4X Rangpur lime rootstocks. Results are presented as a stress condition / control condition gene expression ratio. B) Gene expression in roots of 2X and 4X Rangpur lime rootstocks grafted with Valencia scion. Results are presented as a stress condition / control condition gene expression ratio. C) Gene expression in roots of 2X RL/V and 4X RL/V genotypes grown in control condition. Results are presented as a 4X RL/V / 2X RL/V gene expression ratio. D) Gene expression in roots of 2X RL/V and 4X RL/V genotypes after 31 days of stress. Results are presented as a 4X RL/V / 2X RL/V gene expression ratio. Genes name and functions are presented in Table 1.

Supplemental Figure S1: Expression patterns of genes between Valencia sweet orange grafted on RL4X and Valencia sweet orange grafted on RL2X in response to water deficit.

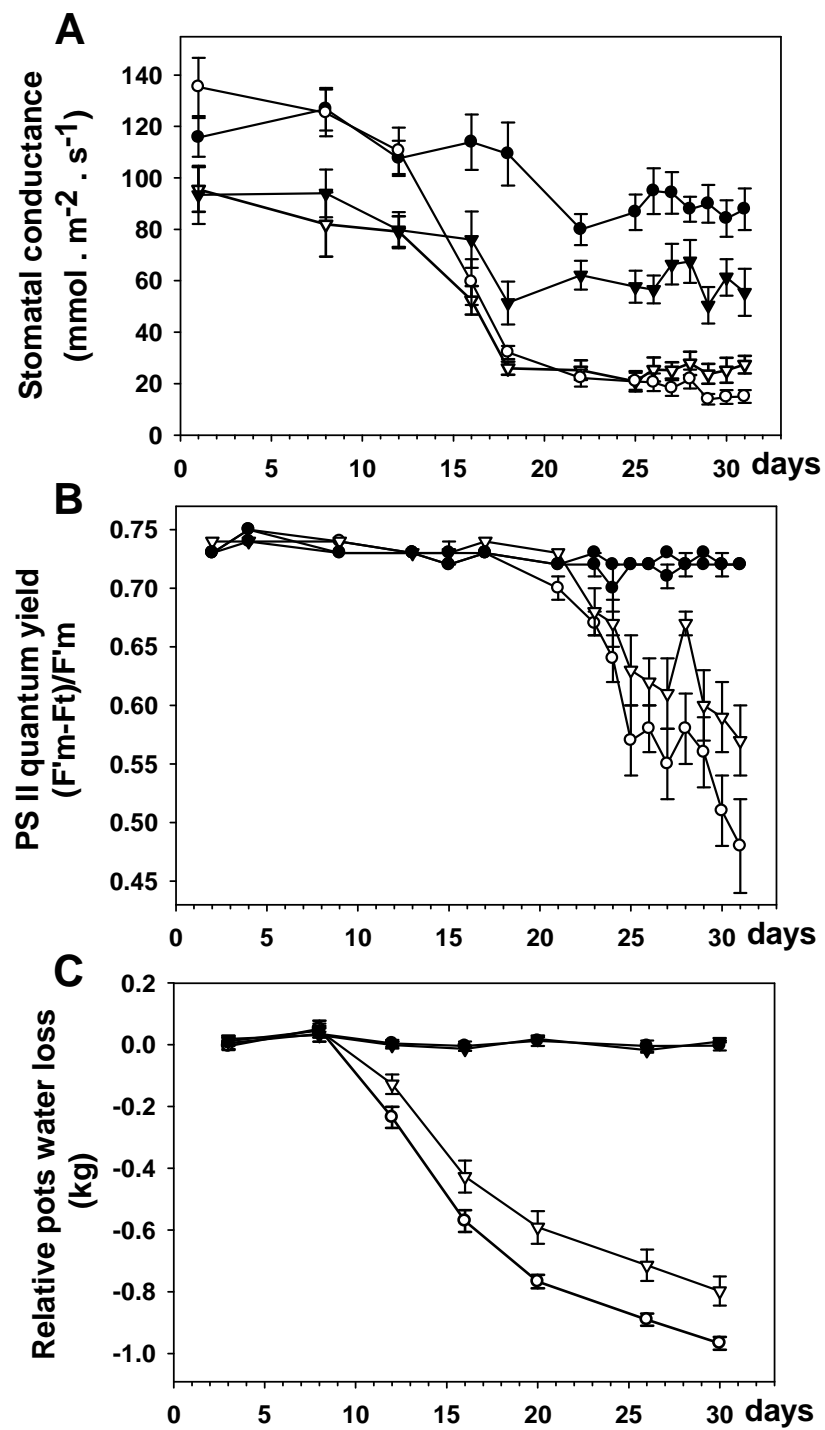


Fig. 1

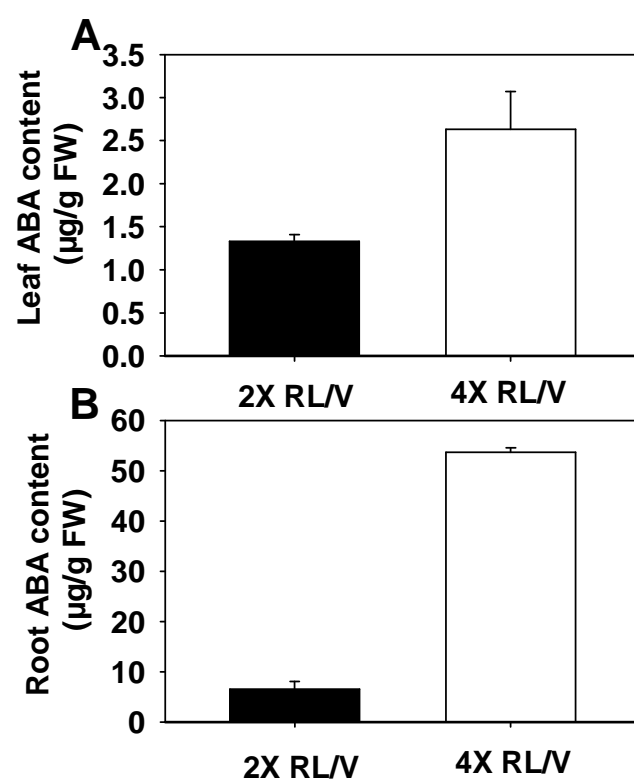


Fig. 2

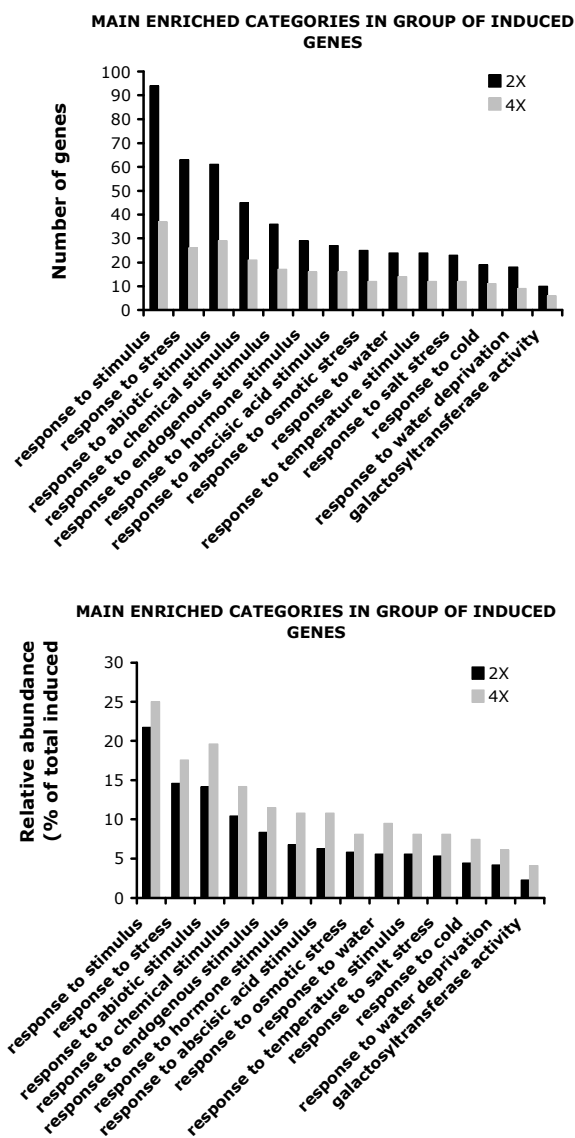


Fig. 3

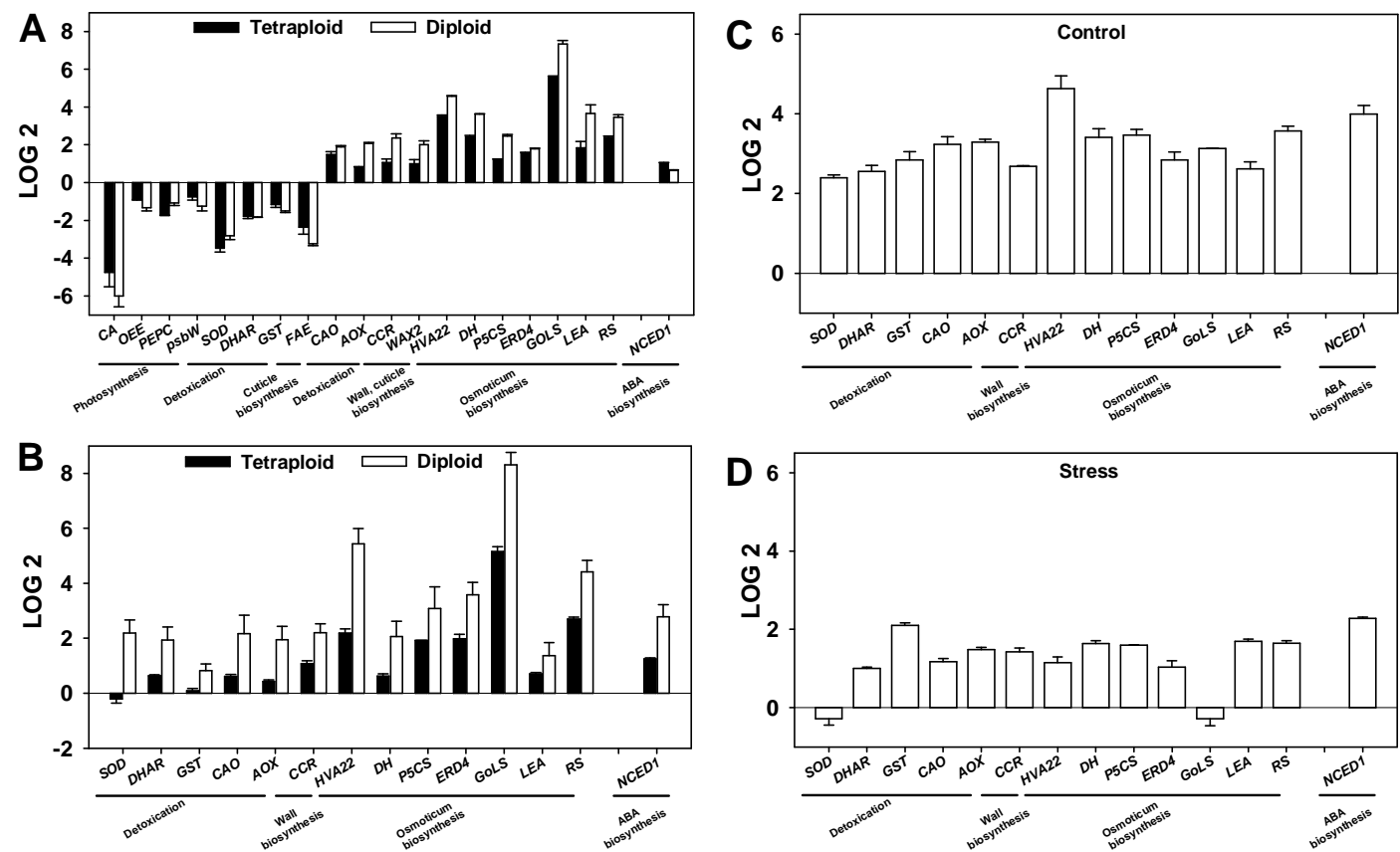
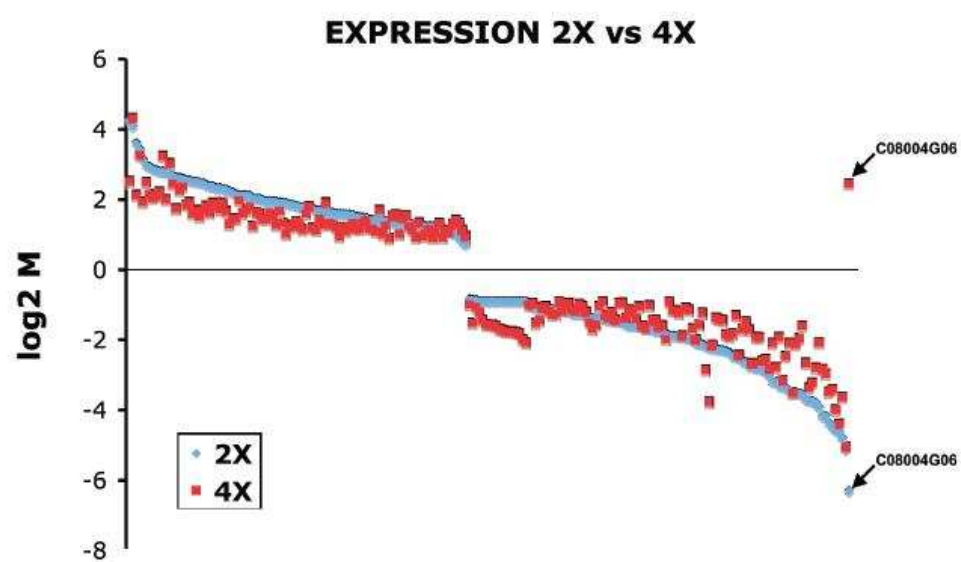


Fig. 4



Supplemental Fig. S1

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

5

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1. LES PORTE-GREFFES AUTOTETRAPLOIDES D'AGRUMES ET LE STRESS SALIN

5.1.1. Le stress salin et les variétés francs de pieds

Les plants tétraploïdes d'agrumes sont considérés comme étant plus tolérant au stress salin que leurs homologues diploïdes : alors que l'accumulation des chlorures était similaire entre plants tétraploïdes et diploïdes, seules les feuilles des plants diploïdes présentaient des chloroses (Salhe *et al.*, 2008 ; Mouhaya, 2008). Cependant, cette meilleure tolérance des plants tétraploïdes n'a pas été observée lorsque les plants étaient soumis à un stress salin sans limitation d'eau, *i.e.* avec une fréquence d'arrosage quotidienne. Le potentiel hydrique du substrat était alors maintenu à une valeur proche du potentiel osmotique imposé par la solution saline utilisée (*cf* Art.2). Dans ces conditions, l'accumulation des chlorures mesurée dans les feuilles des plants tétraploïdes était supérieure à celles des plants diploïdes, avec apparition de chloroses chez tous les génotypes. Cette accumulation des ions chlorures a été inversement corrélée à la chute du rendement quantique maximal du PSII, suggérant un rôle important de la toxicité ionique dans la sensibilité des plants tétraploïdes. Le maintien du potentiel hydrique du substrat à une valeur constante aurait eu pour effet de différer la fermeture des stomates. Entraînés par le flux transpiratoire, des sels se seraient accumulés en grande quantité dans les feuilles. De part leur morphologie foliaire, les plants tétraploïdes auraient accumulé plus de sels et se seraient montrés, par conséquent, plus sensibles au stress salin. Cependant, le matériel permettant d'effectuer les mesures d'échange gazeux au niveau de la feuille faisant défaut au cours de ces premières expériences, il n'a pas été possible de corroborer cette différence d'accumulation des sels à une éventuelle différence du flux transpiratoire entre plants diploïdes et tétraploïdes.

Les plants tétraploïdes étaient plus tolérants que les diploïdes au stress salin lorsque la fréquence d'arrosage était limitée à deux arrosages par semaine. Dans ces conditions, il peut être supposé que de grandes variations du potentiel hydrique du substrat entre deux arrosages aient pu avoir lieu (Salhe *et al.*, 2008 ; Mouhaya *et al.*, 2009). Dans le cas où les plants diploïdes seraient de plus grands consommateurs d'eau, la diminution du potentiel hydrique du substrat entre deux arrosages serait effectivement plus rapide pour des plants diploïdes que pour des plants tétraploïdes. Les effets combinés de cette consommation et de la présence des sels dans le substrat abaisseraient plus rapidement le potentiel hydrique du sol chez les plants

diploïdes, ce qui pourrait les exposer à une limitation hydrique chaque fois plus importante entre chaque nouvel arrosage. Une dissemblance des besoins en eau entre plants tétraploïdes et diploïdes pourrait très bien être corrélée avec la différence de croissance qui existe entre eux. Une faible consommation d'eau est un des caractères recherchés dans le développement de nouveaux porte-greffes plus résistants à la sécheresse.

5.1.2. Le greffage sur plants autotétraploïdes

Le greffage de variétés sur porte-greffes autotétraploïdes n'a conduit à aucune amélioration de tolérance au stress salin comparé au greffage sur plants diploïdes. Ce résultat suggère que les ions absorbés traversent avec une même facilité les tissus de la racine des plants autotétraploïdes et diploïdes. La tolérance au stress salin des variétés francs de pieds autotétraploïdes observée dans l'article 1 semblait dépendre de la disponibilité de l'eau au niveau du substrat entre deux arrosages (*cf* Art.2). Or, cette tolérance, observée dans l'article 1 sur des variétés francs de pieds, n'a pas été observée pour des cédratiers greffés sur Citrange carrizo autotétraploïdes sujets à un choc salin : compte tenu de la concentration appliquée en NaCl de 500 mM, la toxicité des ions a rapidement affecté les cédratiers greffés sur Citrange carrizo autotétraploïdes indépendamment du statut hydrique du sol. Un fait marquant a concerné plus particulièrement l'allotétraploïde FHLORAG1 : franc-de-pied, il s'est montré plus résistant au stress que tous les autres génotypes, qu'ils soient diploïdes ou autotétraploïdes (*cf* Art.2). Cependant, toujours comparé aux autres génotypes, il a été le plus sensible lorsqu'il a été utilisé comme porte-greffe. Par conséquent, la tolérance au stress salin du FHLORAG1 pourrait d'avantage être liée aux spécificités de ses parties aériennes que à celles de sa racine (*cf* § 4.3.1.). Les feuilles du FHLORAG1 arborent un vert très foncé, évoquant de fortes concentrations en chlorophylle. Ces observations laissent penser que la tolérance du FHLORAG1 au stress salin serait liée à une meilleure protection de la machinerie cellulaire des feuilles. Plus particulièrement, les réactions associées à la photosynthèse bénéficieraient d'une meilleure défense contre les ROS générés sous l'effet du stress, que se soient en empêchant leur formation ou en améliorant la détoxification. De nouvelles études sous contrainte saline, prenant en compte l'activité des enzymes de détoxification au niveau des parties aériennes, seraient à envisager concernant le FHLORAG1 (greffés et non greffés). L'activité et l'expression génique des mêmes enzymes que celles exposées dans l'article 2 et 3 pourraient être analysées lors de cette étude. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est un bon marqueur pour estimer la famille des ROS car il est, parmi la

famille des ROS, le plus stable, et donc le plus facile à détecter. Des dosages de peroxyde d'hydrogène pourraient également compléter ce travail dans le but de déterminer le niveau de synthèse des ROS au niveau des feuilles. Bien que les qualités adaptatives du FLHORAG1 franc-de-pied vis-à-vis de différents stress abiotiques (stress salin et chlorose ferrique) soient avérées dans le cadre d'essais multilocaux, il reste à démontrer sa valeur en tant que porte-greffe. En effet, son association avec le clémentinier commun et le cédratier de Corse n'a pas été concluante lors de cette étude.

5.2. LA LIME RANGPUR AUTOTETRAPLOÏDE ET LE DÉFICIT HYDRIQUE

5.2.1. L'autotétraploïdie et la tolérance au déficit hydrique

• *Les modifications génétiques et phénotypiques*

L'autotétraploïdisation résulte d'un doublement du matériel chromosomique à l'identique. Les différences morphologiques et anatomiques entre une espèce diploïde et son homologue autotétraploïde sont clairement marquées. Ces différences observées peuvent résulter d'une altération du contrôle épigénétique de l'expression du génome lorsque le matériel génétique est multiplié (Siroky *et al.*, 1999 ; Martelotto *et al.*, 2007). Or, les bouleversements phénotypiques qui s'opèrent chez les autotétraploïdes seraient moins une conséquence des variations des profils de méthylation que d'un effet du dosage chromosomique (Siroky *et al.*, 1999 ; Stupar *et al.*, 2007). L'étude du transcriptome entre la lime Rangpur autotétraploïde et la lime Rangpur diploïde renforce cette hypothèse puisque peu de changements de profils d'expression ont été constatés (*cf* Art.3). Toutefois, les gènes *HIF* et *Cdc2K*, codant respectivement une histone et une Mak-type kinase, étaient surexprimés chez la lime Rangpur autotétraploïde (*cf* Art.3). La surexpression de *HIF* chez la lime Rangpur autotétraploïde suggère que des modifications de régulations épigénétiques peuvent survenir chez les autopolyploïdes (Chua and Gray, 2006 ; Nelissen *et al.*, 2007), bien que celle-ci semblent être très limitées. L'étude de *HIF* permettrait d'identifier des altérations de régulation épigénétique, notamment par méthylation, et d'identifier leurs éventuelles implications sur les modifications anatomiques survenant chez les autotétraploïdes. *Cdc2K*, qui participe au contrôle de la division et de la différenciation cellulaire (Fowler *et al.*, 2000), a également été surexprimé chez la lime Rangpur autotétraploïde. Ceci implique qu'il puisse y avoir une modification des mécanismes du contrôle de la division cellulaire entre diploïdes et autotétraploïdes. De même, l'accroissement de la biomasse observée chez des allopolyplodes

a été associé à des modifications épigénétiques agissant sur les voies métaboliques et physiologiques sous contrôle du rythme circadien (Ni *et al.*, 2009). Par conséquent, les gènes régulant la division et la différenciation cellulaire, ainsi que ceux sous influence du cycle circadien, pourraient être étudiés de manière à vérifier leurs implications dans l'établissement du « phénotype autotétraploïde » lors de la morphogénèse. En général, de part leur épaisseur, les tissus tétraploïdes sont plus résistants aux attaques mécaniques. Par exemple, un cortex racinaire plus épais le rendrait plus résistant aux attaques des nématodes, et une cuticule foliaire plus épaisse permettrait de limiter au mieux les pertes hydriques durant une période de sécheresse (Damme, 1990 ; Sanchez *et al.*, 2001 ; Yephremov et Schreiber, 2007). Comme cela a été observé chez la lime Rangpur, les caractères autotétraploïdes tendent vers une amélioration de la tolérance aux stress environnementaux : accroissement de l'épaisseur foliaire, de la cuticule, du tégument du fruit, du diamètre des racines, de la taille des cellules, réduction de la croissance, etc. (*cf* Art.3).

• *L'ABA*

La voie de biosynthèse des chlorophylles, qui est connectée en amont à celle des caroténoïdes, aboutit à la production de l'ABA (Genji *et al.*, 2007 ; Shan et Li, 2008). La concentration en caroténoïdes et en ABA chez les fruits allotétraploïdes était plus importante que chez les fruits diploïdes à un même stade de maturation (communication Bassène Jean-Baptiste). De même, la surexpression du gène *lhca2* codant le complexe protéine-pigment du photosystème II a été liée à une augmentation de la taille cellulaire et du taux de chlorophylle chez *Arabidopsis thaliana* (Meehan *et al.*, 1996). Or, le taux de chlorophylle des feuilles, la taille cellulaire et le taux d'expression de *lhca2* mesurés chez la lime Rangpur autotétraploïde étaient également supérieurs à ceux de la lime Rangpur diploïde (*cf* Art.3). Ces données suggèrent que les feuilles tétraploïdes pourraient contenir une plus grande concentration en caroténoïdes. Or, les caroténoïdes sont connus pour jouer un rôle central dans la stabilisation du PSII. Ils agissent en limitant les surexcitations du PSII qui produisent les ROS (Havaux *et al.*, 1996). Serait-il possible que le taux de chlorophylles des feuilles autotétraploïdes, supérieur à celui des feuilles diploïdes, puisse améliorer la protection des centres réactionnels du PSII lors d'un stress?

Le Norflurazone, un inhibiteur connu agissant sur les premiers précurseurs de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, affecte la synthèse de l'ABA, mais également la synthèse des chlorophylles (Jung, 2004 ; Irada *et al.*, 2005 ; Kusumoto *et al.*, 2006). Les plants traités au Norflurazone présentent une dépigmentation chlorophyllienne très importante des feuilles,

faisant apparaître des tâches blanches sur fond vert comme le ferait de l'eau de javel sur un tissu teinté. La stabilité des voies de biosynthèse des chlorophylles entre autotétraploïdes et diploïdes pourrait être éprouvée par un traitement au Norflurazone, et serait un indicateur des relations entre la ploïdie, la synthèse des chlorophylles et la tolérance au stress (protection des centres réactionnels du PSII). Un délai d'apparition des plages dépigmentées sur les feuilles entre plants autotétraploïdes et plants diploïdes pourrait rendre compte de cette tolérance.

• *Le maintien de l'intégrité cellulaire*

Il a été démontré qu'une forte production de HSP au niveau des feuilles améliorerait la tolérance des plantes au stress thermique associé à un déficit hydrique (Richu *et al.*, 2007 ; Sato et Yokoya, 2008 ; Timperio *et al.*, 2008 ; Huang et Xu, 2008). La meilleure tolérance au stress thermique observé chez les plants autotétraploïdes pourrait-elle être expliquée par une plus forte synthèse de HSP par les feuilles des génotypes autotétraploïdes ?

L'intégrité cellulaire, lors d'un stress thermique, peut aussi dépendre du degré de stabilité membranaire (*cf* § 1.6.3.). Les observations au microscope ont montré que les cellules tétraploïdes sont généralement de taille supérieure à leurs homologues diploïdes. L'évènement de polyploïdisation, qui s'accompagne d'une augmentation de la taille des cellules, conduit-elle également à une amélioration de la stabilité membranaire ? Cette stabilité est directement liée au degré de saturation en oméga 3 des membranes plasmiques (Iba *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2006). Il serait alors intéressant de pouvoir quantifier les niveaux d'oméga 3 intervenant dans la stabilité membranaire entre cellules autotétraploïdes et cellules diploïdes d'un même tissu. L'activité des enzymes de détoxification des ROS est un autre facteur permettant de maintenir l'intégrité cellulaire lors d'un stress thermique. Chez *Dioscorea zingiberensis*, lors d'une exposition des plants à 42°C (stress thermique), il s'est avéré que l'activité des enzymes impliqués dans la détoxification des ROS (superoxyde dismutase, catalase, peroxydase, ascorbate peroxydase et glutathion réductase) était plus forte chez les plants tétraploïdes que chez les plants diploïdes, ce qui abaissait d'autant plus les niveaux de peroxyde d'hydrogène, de malondialdéhyde (péroxydation lipidique) et d'anions superoxydes des feuilles des *Dioscorea zingiberensis* tétraploïdes (Zhanga *et al.*, 2009). Par conséquent, il serait également envisageable de réaliser une étude similaire entre des agrumes autotétraploïdes et diploïdes d'une même variété soumis à un déficit hydrique ou un stress salin, utilisés ou non comme porte-greffe (*cf* Art. 3 et 4), afin de vérifier les hypothèses émises sur le maintien de l'intégrité cellulaire des autotétraploïdes.

• *Les phytohormones*

Si la synthèse constitutive en ABA est différente entre plants autotétraploïdes et diploïdes de même âge, qu'en est-il des autres phytohormones? Les balances hormonales entre l'ABA, les gibbérellines, l'auxine, les brassinostéroïdes et les cytokinines seraient modifiées chez les autotétraploïdes et auraient un impact direct sur les différences de croissance et de morphologie observées entre autotétraploïdes et diploïdes. Par exemple, il est connu que les mutants déficients en gibbérellines présentent un phénotype nanisant (Wilson et Somerville, 1995 ; Magome *et al.*, 2004), phénotype également observé entre plants diploïdes et autotétraploïdes. De même, le chevelu racinaire, dont le développement est sous contrôle de l'auxine, présente un aspect plus trapu chez les variétés autotétraploïdes que chez les variétés diploïdes (Pitts *et al.*, 1998 ; Estelle, 2002). Etudier l'évolution de la balance hormonale lors de la morphogénèse entre autotétraploïdes et diploïdes pourrait nous renseigner sur l'impact des phytohormones dans l'établissement du phénotype lié à la polyploïdie.

• *Le tréhalose*

Des plants de tabac et de pomme de terre transgéniques surexprimant de façon constitutive la tréhalose synthase produisent de fortes concentrations en tréhalose, ce qui améliore leur tolérance aux stress abiotiques (Romero *et al.*, 1997 ; Yeo *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2005 ; Stiller *et al.*, 2008). Ces plants transgéniques présentent une morphologie singulière qui les distingue des plants sauvages et qui rappelle les différences observées entre la lime Rangpur autotétraploïde et la lime Rangpur diploïde : les plants surexprimant la tréhalose synthase possèdent des feuilles plus épaisses et d'un vert plus foncé que celles des plants sauvages. Ces plants transgéniques montrent aussi un retard de croissance par rapport aux plants sauvages (Romero *et al.*, 1997 ; Yeo *et al.*, 2000). Ce phénomène est également observé chez la lime Rangpur autotétraploïde comparé à la lime Rangpur diploïde (*cf* Art.3). Le taux de tréhalose produit chez la lime Rangpur autotétraploïde est-il supérieur à celui produit par la lime Rangpur diploïde? L'étude du transcriptome réalisé chez la lime Rangpur autotétraploïde n'a pas révélé de surexpression de la tréhalose synthase (*cf* Art.3). Des modifications post-transcriptionnelles pourraient-elles alors influencer sur le taux de tréhalose produit chez la lime Rangpur autotétraploïde? Doser et comparer le taux de tréhalose produit de manière constitutive entre la lime Rangpur autotétraploïde et la lime Rangpur diploïde pourrait nous renseigner sur ce fait.

5.2.2. Modification du comportement physiologique de la variété greffée sur porte-greffe autotétraploïde

• Réduction de la conductance stomatique

La conductance stomatique mesurée en condition témoin sur l'oranger Valencia delta greffé sur la lime Rangpur autotétraploïde a clairement montré un flux transpiratoire 2 fois inférieur à celui mesuré sur le même oranger Valencia delta greffé sur la lime Rangpur diploïde (*cf* § 4.6). Il y a donc un effet direct du porte-greffe autotétraploïde sur la conductance stomatique des feuilles du greffon. La théorie la plus plausible est celle d'un composé synthétisé au niveau de la racine qui, véhiculé par la sève jusqu'aux parties aériennes, aurait pour effet de limiter l'ouverture stomatique des feuilles du greffon. Or, lors d'un déficit hydrique, l'ABA est synthétisé en abondance dans la racine, puis transporté par la sève xylémique jusque dans les feuilles où il déclenche la fermeture stomatique (Davies et Zhang, 1991 ; Triboulot *et al.*, 1996 ; Tallman, 2004 ; Mishra *et al.*, 2006). L'ABA est donc suspecté de jouer le rôle de ce composé : la production constitutive de l'ABA du porte-greffe autotétraploïde serait suffisamment supérieure à celle d'un porte-greffe diploïde et limiterait l'ouverture stomatique chez le greffon. Il a été possible de mesurer cette concentration d'ABA au niveau des feuilles et des racines chez l'oranger Valencia delta greffé sur la lime Rangpur autotétraploïde et diploïde : les concentrations de l'ABA de la feuille (greffon) et de la racine (porte-greffe) mesurées chez l'oranger Valencia delta greffé sur la lime Rangpur autotétraploïde étaient respectivement supérieures à celles mesurées chez l'oranger Valencia delta greffé sur la lime Rangpur diploïde en condition témoin. Cette grande quantité d'ABA mesurée dans la racine de la lime Rangpur autotétraploïde est accompagnée par la surexpression du gène *NCED* qui contrôle la synthèse de cette hormone végétale via la voie des caroténoïdes (*cf* Art.5). Le gène *NCED*, normalement activé lors d'un déficit hydrique (Thompson *et al.*, 2000 ; Chernys and Zeevaart, 2000), était surexprimé au niveau de la racine de la lime Rangpur autotétraploïde alors que l'étude du transcriptome du greffon par puces à ADN et par qRT-PCR montrait clairement que le greffon n'était pas en état de stress (*cf* Art.5). Il est donc concevable que le gène *NCED* soit constitutivement et spécifiquement surexprimé au niveau de la racine de la lime Rangpur autotétraploïde par rapport à la racine de la lime Rangpur diploïde. Ceci entraînerait une production plus importante de l'ABA qui, véhiculé de la racine vers les feuilles par le flux de sève, aboutirait à une fermeture partielle des stomates chez le greffon. Cependant, d'après une récente étude réalisée chez *Arabidopsis thaliana* (Ikegami *et al.*, 2008), la synthèse de l'ABA semble s'effectuer préférentiellement au niveau des feuilles lors d'un déficit hydrique. Compte tenu que la quantité de caroténoïdes

de la feuille est supérieure à celle de la racine et sachant que la synthèse de l'ABA dépend de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, il est naturel de penser que la majeure partie de la synthèse de l'ABA ait lieu au niveau de la feuille. L'ABA, ainsi synthétisé par les feuilles suite à une modification du pH de la sève (conséquence du déficit hydrique perçu par la racine), serait redistribuée entre les cellules du mésophylle et l'apoplasme et conduirait à la fermeture stomatique, puis serait transporté par le phloème jusqu'à la racine. L'ABA serait alors progressivement accumulé dans la racine du fait du ralentissement des flux transpiratoires et des flux de sève sous l'effet du déficit hydrique. De fortes concentrations d'ABA sont alors présentes à la fois dans les feuilles et dans la racine. Après une réhydratation faisant suite à une phase de déficit hydrique prolongée, les flux transpiratoires reprennent et entraînent l'ABA stocké dans la racine jusqu'aux feuilles par les flux de sève, ces fortes concentrations en ABA déclenchent alors une production importante d'éthylène au niveau des feuilles qui entraîne l'abscission foliaire chez les agrumes (Gomez-Cadenas *et al.*, 1996). Par conséquent, la production de l'ABA de la racine semble être négligeable comparée à celle de la feuille. Le gène *NCED* étant surexprimé au niveau de la racine de la lime Rangpur autotétraploïde greffé avec l'oranger Valencia delta (*cf* Art.5), il est attendu que ce gène soit également surexprimé au niveau des feuilles. Or, une étude de l'expression génique du gène *NCED* de la feuille par qRT-PCR a montré qu'il n'y avait pas de surexpression de ce gène chez les variétés *Poncirus trifoliata*, mandarinier Willow leaf et Citrange carrizo autotétraploïdes par rapport aux variétés diploïdes respectives (*cf* Art.2 ; Mouhaya, 2008). De fait, il serait pertinent de vérifier si le gène *NCED* est effectivement surexprimé au niveau de la racine des variétés *Poncirus trifoliata*, mandarinier Willow leaf et Citrange carrizo autotétraploïdes par rapport aux diploïdes respectifs, afin de déterminer si ce trait est bien une conséquence de l'autopolyploïdie.

Par ailleurs, il a été démontré que la synthèse de l'ABA au niveau de la racine, déclenchée lors d'un déficit hydrique, était accompagnée d'une alcalinisation de la sève (Hartung et Radin, 1989 ; Wilkinson et Davies, 1997 ; Guo *et al.*, 2004). Ce changement de pH de la sève permet une relocalisation de l'ABA de la feuille, dirigeant alors préférentiellement l'ABA vers les cellules de garde aux dépends, en temps normal, des cellules du mésophylle (Schurr et Gollan, 1990 ; Wilkinson et Davies, 1997 ; Hartung *et al.*, 1998 ; Wilkinson, 1999). Il serait donc nécessaire d'identifier quel est le signal transmis de la racine vers la feuille, entre l'ABA et le pH, pouvant provoquer une fermeture partielle des stomates. Il serait intéressant, dans un premier temps, de déterminer si une différence de pH entre la sève d'un plant autotétraploïde et d'un plant diploïde en condition témoin existe. Puis,

dans un second temps, de vérifier si cette éventuelle différence de pH mesurée se retrouve dans la sève du greffon. Enfin, une étude qRT-PCR des gènes impliqués dans la synthèse de l'ABA de la racine des *Poncirus trifoliata*, mandarinier Willow leaf et Citrange carrizo autotétraploïdes devra être réalisée par rapport aux diploïdes respectifs, afin de confirmer ou d'infirmer les résultats déjà obtenus dans l'article 5.

● **Réduction de la production et maintien de la qualité des fruits**

Quel est l'impact d'un porte-greffe autotétraploïde sur la fructification du greffon? Grâce à leur caractère tolérant aux contraintes biotiques et abiotiques, les porte-greffes autotétraploïdes paraissent être des porte-greffes à fort potentiel pour l'agrumiculture de demain. Dans la perspective d'une éventuelle utilisation commerciale, il est absolument nécessaire de connaître l'influence de l'autotétraploïdie d'un porte-greffe sur la fructification du greffon. Une étude a été initiée à la station de recherche agronomique INRA/CIRAD de San Giuliano (Corse), afin d'évaluer la production de fruits du clémentinier SRA92 greffé sur des porte-greffes autotétraploïdes par rapport à celle du clémentinier SRA92 greffé sur des porte-greffes diploïdes. Des résultats préliminaires, obtenus sur la production fruitière du clémentinier SRA92 greffé sur *Poncirus trifoliata* autotétraploïde, a démontré que, si la production moyenne de fruit est effectivement divisée par deux par rapport au même clémentinier SRA92 greffé sur *Poncirus trifoliata* diploïde, la qualité du fruit est nullement altérée (poids moyen du fruit, acidité, indice de maturité, concentration en caroténoïde) (Communication, Hussein Sajjad). L'utilisation de porte-greffes tétraploïdes semble diminuer la production fruitière du greffon. Ceci est principalement dû au fait que la croissance des plants tétraploïdes est plus faible que celle des diploïdes. Ce caractère peut être un atout afin d'abaisser le taux de croissance de certaines variétés de porte-greffes jugées trop vigoureuses comme le cultivar Volkameriana (*Citrus limonia* .Osbeck) ou le cultivar Macrophylla (*Citrus aurantium*). La perte de productivité, observée chez les plants greffés sur porte-greffes tétraploïdes, pourrait être palliée par une augmentation de la densité de plantation des parcelles cultivées et par l'application de techniques de taille favorisant la croissance du greffon. De même, il serait nécessaire d'étudier l'efficacité d'utilisation de l'eau, *i.e.* de déterminer avec quel minimum d'eau possible un processus, tel que la fructification, puisse s'accomplir normalement, entre un porte-greffe autotétraploïde et un porte-greffe diploïde.

• *Les porte-greffes d'agrumes autotétraploïdes et le déficit hydrique*

L'utilisation de la lime Rangpur autotétraploïde comme porte-greffe à la place de la lime Rangpur diploïde apporte un avantage certain lors d'un déficit hydrique. En effet, les expériences menées en serre ont démontré qu'il y avait une amélioration de la tolérance au déficit hydrique chez les plants greffés (oranger Valencia delta et cédratier) sur la lime Rangpur autotétraploïde par rapport à ceux greffés sur la lime Rangpur diploïde (*cf* Art. 4 et 5). Ces résultats sont à corrélérer aux mesures de conductance stomatique abaissées de moitié chez les plants greffés sur la lime Rangpur autotétraploïde en condition témoin. Le greffage sur la lime Rangpur autotétraploïde entraîne une diminution de moitié de la conductance stomatique du greffon, ce qui signifie que la perte hydrique induite par la transpiration est réduite par rapport à un plant greffé sur la lime Rangpur diploïde. Dans ce cas, les réserves en eau du substrat ont été d'autant plus préservées. Ainsi, une variété greffée sur lime Rangpur autotétraploïde résistera plus longtemps sans apport d'eau par rapport à la même variété greffée sur lime Rangpur diploïde. Ces résultats ont été obtenus en condition semi contrôlé en serre. Il est donc indispensable que ces résultats soient vérifiés dans des conditions naturelles au champ et que d'autres variétés de porte-greffes autotétraploïdes puissent être testées.

5.3. ESSAIS AU CHAMP DE PORTE-GREFFES D'AGRUMES TETRAPLOÏDES

Afin de vérifier les résultats de bonne tolérance aux stress abiotiques obtenus en serre, un essai au champ de porte-greffes autotétraploïdes et diploïdes greffés avec les mêmes variétés a été initié sous l'égide de l'IVIA et du CIRAD. L'oranger Valencia delta greffé sur des porte-greffes autotétraploïdes et diploïdes de lime Rangpur, de Citrange carrizo, de mandarinier Cléopâtre et de Macrophylla, ainsi que sur l'allotétraploïde FLHORAG1, seront testés au champ à la station de recherche agronomique de Elche (Alicante, Espagne). Cette région, au sud d'Alicante, présente la particularité d'avoir des sols calcaires et salins (présence d'eau de mer dans les aquifères) qui la rend impropre à la culture agrumicole. Ces sols à fortes contraintes abiotiques permettront de vérifier le potentiel des porte-greffes tétraploïdes et de confirmer, ou d'infirmer, leur intérêt pour l'agrumiculture. Les arbres ont été plantés au printemps 2009. Leur tolérance aux stress abiotiques (stress salin, chlorose ferrique, déficit hydrique) sera étudiée tout comme la fructification et le développement (croissance) des greffons.

BIBLIOGRAPHIE

6

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelly, C., Lachaal, M., Grignon, C., Soltani, A., and Hajji, M. (1995) Periodic association of obligate halophytes and of glycophytes in a saline, hydromorphic ecosystem in a semi-arid region. *Agronomie*. 15: 557-568.
- Abrol, I. P., Yadav, J. S. P., and Massoud, F. I. (1988) Salt-affected soils and their management. *FAO soils Bulletin n°39*. FAO, Rome. 143p.
- Adams, K. L., Percifield, R., and Wendel J. F. (2004) Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics*. 168: 2217-2226.
- Agarwal, P. (2008) Salt stress tolerance in crop plants: molecular and physiological considerations. *Advances in plant physiology*. 10: 119-144.
- Albertin, W., Brabant, P., Catrice, O., Eber, F., Jenczewski, E., Chevre, A. M., and Thiellement, H. (2005) Autopolyploidy in cabbage (*Brassica oleracea* L.) does not alter significantly the proteomes of green tissues. *Proteomics*. 5: 2131-2139.
- Alexiadis, A. (2007) Global warming and human activity: a model for studying the potential instability of the carbon dioxide/temperature feedback mechanism. *Ecological Modelling*. 203: 243-256.
- Alleman, M., and Doctor, J. (2000) Genomic imprinting in plants: observations and evolutionary implications. *Plant Molecular Biology*. 43: 147-61.
- Alvarez Perello, E. A. (2001) Latest statistics of the world population according to the United Nations. *Geriatrics*. 17: 231-233.
- Andjelkovic, V., and Thompson, R. (2006) Changes in gene expression in maize kernel in response to water and salt stress. *Plant Cell Reports*. 25: 71-79.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A., Blumwald, E. (1999) Salt tolerance conferred by over expression of vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science*. 285: 1256-1258.
- Aryal, S.K., Mein, R., and O'Loughlin, E. (1999) A similarity approach to study the hydrologic behaviour of hillslopes. Water 99 Joint Congress, 25th Hydrology and Water Resources Symposium, 6-8 July 1999, Brisbane. 367-372.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 601-639.
- Askin, T., and Ozdemir, N. (2003) Soil bulk density as related to soil particle size distribution and organic matter content. *Agriculture Scientific and Professional Review*. 9: 52-55.
- Astegiano, E. D., and Pilatti, R. A. (2003) Foliar expansion of sorghum in response to short and sudden periods of water stress. *Agronomia Tropical (Maracay)*. 53: 73-86.

- Audran, C., Borel, C., Frey, A., Sotta, B., Meyer, C., Simonneau, T., and Marion-Poll, A. (1998) Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiology*. 118: 1021-1028.
- Ayers, R. S., and Westcot, D. W. (1989) *Water quality for agriculture*. FAO irrigation and drainage. FAO, Rome. 29p.
- Balnokin, Yu. V., Kotov, A. A., Myasoedov, N. A., Khailova, G. F., Kurkova, E. B., Lun'Kov, R. V., and Kotova, L. M. (2005) Involvement of long-distance Na⁺ transport in maintaining water potential gradient in the medium-root-leaf system of a halophyte *Suaeda altissima*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 52: 489-496.
- Bandurska, H. (2001) Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plants confine cell membrane injuries? II. Proline accumulation during hardening and its involvement in reducing membrane injuries in leaves subjected to severe osmotic stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 23: 483-490.
- Bañuls, J., and Primo-Millo, E. (1992) Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of Citrus plants. *Physiologia Plantarum*. 86: 115-123.
- Barrero, J. M., Rodriguez, P. L., Quesada, V., Piqueras, P., Ponce, M. R., and Micol, J. L. (2006) Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of *NCED3*, *AAO3* and *ABAI* in response to salt stress. *Plant, Cell and Environment*. 29: 2000-2008.
- Barrett, H. C., and Hutchinson, D. J. (1978) Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of Citrus. *Journal of Economic Botany*. 32: 27-45.
- Barrett, H. C. (1992) An autotetraploid of the Key lime, *Citrus aurantifolia*. *Fruit Varieties Journal*. 46: 166-170.
- Beck, S. L., Dunlop, R. W., and Fossey, A. (2003) Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141: 177-181.
- Bellaire, B. A., Carmody, J., Braud, J., Gossett, D. R., Banks, S. W., Lucas, M. C., and Fowler, T. E. (2000) Involvement of abscisic acid-dependent and -independent pathways in the upregulation of antioxidant enzyme activity during NaCl stress in cotton callus tissue. *Free Radical Research*. 33: 531-545.
- Ben-Gal, A., Borochoy-Neori, H., Yermiyahu, U., and Shani, U. (2009) Is osmotic potential a more appropriate property than electrical conductivity for evaluating whole-plant response to salinity? *Environmental and Experimental Botany*. 65: 232-237.
- Benz, B. W., and Martin, C. E. (2006) Foliar trichomes, boundary layers, and gas exchange in 12 species of epiphytic *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Journal of Plant Physiology*. 163: 648-656.

- Björkman, O., Badger, M. R., and Armond, P. A. (1980) Response and adaptation of photosynthesis to high temperatures. In *Adaptation of Plants of Water and High Temperatures Stress*. N. C. Turner and P. J. Kramer, Wiley, New York, 233-249.
- Bofah, K. K., and Owusu, Y. (1986) The eolian sand problems arising from desertification. *Environmental Monitoring and Assessment*. 6: 283-292.
- Boman, B. J., Zekri, M., and Stover, E. (2005) Managing salinity in citrus. *HortTechnology*. 15: 108-113.
- Bonner, J., and Galston, A. W. (1952) *Principles of Plant Physiology*. Freeman, San Francisco, 499p.
- Bot, A. J., Nachtergaele, F.O., and Young, A. (2000) *Land resource potential and constraints at regional and country levels*. FAO, Rome, 122p.
- Boyer, J. S., Wong, S. C., and Farquhar, G. D. (1997) CO₂ and water vapor exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant Physiology*. 114: 185-191.
- Bressan, R. A., Nelson, D. E., Iraki, N. M., LaRosa, P. C., Singh, N. K., Hasegawa, P. M., and Carpita, N. C. (1990) Reduced cell expansion and changes in cell wall of plant cells adapted to NaCl. In *Environmental Injury to Plants*. F. Katterman, Academic Press, New York. 137-171.
- Brinker, M., Engelmann, W., Kellmann, J. W., and Piechulla, B. (2001) Circadian rhythms of leaf and stomatal movements in gymnosperm species. *Biological Rhythm Research*. 32: 471-478.
- Brochmann, C., Brysting, A. K., Alsos, I. G., Borgen, L., Grundt, H. H., Scheen, A. C., and Elven R. (2004) Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society*. 82: 521-536.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jhon R. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Burssens, S., Himanen, K., van de Cotte, B., Beeckman, T., Van Montagu, M., Inze, D., and Verbruggen, N. (2000) Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 211: 632-640.
- Bustin, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 25: 169-193.
- Cai, X., Mu, X. J., Zhu, Z. Q., Hua, Z. M., Huang, Y. H., and Sun, Q. X. (1997) Polyembryony and multiple seedlings in apomictic plants. *Acta Botanica Sinica*. 39: 590-595.
- Cao, H., Xu, X. F., Han, Z. H., Wang, X. W., and Guo, T. Q. (2004) Changes of physiological characteristic on photosynthesis in *Malus* seedling leaves during water stress. *Acta Horticulturae Sinica*. 31: 285-290.

- Cameron, J. W., and Frost, H. B. (1968) Genetic, Breeding and nucellar embryonny. In *The Citrus Industry*. W. Reuther, University of California: Riverside. 1: 325-370.
- Cameron, K. D., Teece, M. A., and Smart, L. B. (2006) Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiology*. 140: 176-183.
- Campos, I. V., and Assuncao, M. V. (1990) Saline and hydric stress in the germination and vigour of rice. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 25: 857-862.
- Cavalier-Smith, T. (1978) Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *Journal of Cell Science*. 34: 247-278.
- Chakraborty, D., Chakraborty, A., Tomar, P. S., Garg, R. K., Sahoo, R. N., Choudhury, R. N., Bhavanarayana, S. G., and Naveen Kalra M. (2006) Prediction of hydraulic conductivity of soils from particle-size distribution. *Current Science*. 90: 1526-1531.
- Chang, T. W., Yu, W. S., Liu, Y. H., Wu, C. L., and Lee, P. C. (1997) Decreasing electrical conductivity of irrigation water by dilution. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Environmental Science and Engineering and Toxic and Hazardous Substance Control*. 32: 1861-1872.
- Chauvin, W., Ameglio, T., Prunet, J. P., and Soing, P. (2004) Irrigation of nuts. Knowledge to drive the hydric potential. *Arboriculture Fruitiere*. 586: 17-21.
- Chen, Z. J. (2007) Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology*. 58: 377-406.
- Cheng, W. H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H. C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T., and Sheen, J. (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell*. 14: 2723-2743.
- Chernys, J. T., and Zeevaart, J. A. D. (2000) Characterization of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiology*. 124: 343-353.
- Chourey, K., Ramani, S., and Apte, S. K. (2003) Accumulation of LEA proteins in salt (NaCl) stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Bura Rata and their degradation during recovery from salinity stress. *Journal of Plant Physiology*. 160: 1165-1174.
- Christmann, A., Hoffmann, T., Teplova, I., Grill, E., and Müller, A. (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 137: 209-219.
- Chua, Y. L., and Gray, J. C. (2006) Histone modifications and transcription in plants. *Annual Plant Reviews, Regulation of transcription in plants*. 29: 79-111.
- CNRS. Centre National de Recherche Scientifique. Disponible sur : <http://www.cnrs.fr/>

- Coelho, M. B., Villalobos, F. J., and Mateos, L. (2003) Modeling root growth and the soil-plant-atmosphere continuum of cotton crops. *Agricultural Water Management*. 60: 99-118.
- Colmenero-Flores, J. M., Martinez, G., Gamba, G., Vazquez, N., Iglesias, D. J., Brumos, J., and Talon, M. (2007) Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant Journal*. 50: 278-292.
- Constância, M., Pickard, B., Kelsey, G., and Reik, W. (1998) Imprinting mechanisms. *Genome Research*. 8: 881-900.
- Cooper, W. C. (1961) Toxicity and accumulation of salt in citrus trees on various rootstocks in Texas. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 74: 95-104.
- Costa, W. A. J. M., and Zoysa, G. J. K. (1995) Effects of water stress on root and shoot growth of soyabean (*Glycine max* (L.) Merrill) and rice (*Oryza sativa*). *Sri Lankan Journal of Agricultural Sciences*. 32: 134-142.
- Cote, G. G. (1995) Signal transduction in leaf movement. *Plant Physiology*. 109: 729-734.
- Crafts-Brandner, S. J., and Law, R. D. (2000) Effect of heat stress on the inhibition and recovery of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation state. *Planta*. 212: 67-74.
- Cramer, G. R., Läuchli, A., and Polito, V. S. (1985) Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiology*. 79: 207-211.
- Craig, J. R. (1980) Saline waters: genesis and relationship to sediments and host rocks. In: *Saline Water Proc. Symp. Groundwater Salinity, 46th Annual Meeting*. R.B. Mattox (ed.). Amer. Assoc. Adv. Sci (AAAS), Las Vegas, Nevada.
- Cui, X. K., Ao, C. Q., Zhang, Q., Chen, L. T., and Liu, J. Q. (2008) Diploid and tetraploid distribution of *Allium przewalskianum* Regel. (Liliaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent regions. *Caryologia*. 61: 192-200.
- Dabrowska, J. (1996) The number of chloroplasts in stomata guard cells - a useful character for separating polyploids and diploids. *Beitrage zur Zuchtforschung Bundesanstalt fur Zuchtforschung an Kulturpflanzen*. 2: 239-243.
- Dalmir Singh Meena, P. K. P. (2006) Wheat polyploids as a model system for crop improvement. Plant breeding in post genomics era. Proceedings of Second National Plant Breeding Congress, Coimbatore, India, 1-3 March, 2006. 168-176.
- Damme, P. L. J. van (1990) Adaptations to drought stress in plants. Part I: Typology of drought tolerance and resistance. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent*. 55: 121-126.
- Darab, K., Csillag, J., and Pinter, I. (1980) Studies on the ion composition of salt solutions and of saturation extracts of salt-affected soils. *Geoderma*. 23: 95-111.

- Davenport, R. J., Munoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P. A., Rus, A., and Tester, M. (2007) The Na^+ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na^+ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*. 30: 497-507.
- Davies, W. J., and Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 55-76.
- Davies, W. J., Wilkinson, S., and Loveys, B. (2002) Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water-use efficiency in agriculture. *New Phytologist*. 153: 449-460.
- De Marsily, G. (1995) *L'eau*. Dominos Flammarion, Paris, France.
- Diaz, P., Borsani, O., and Monza, J. (1999) Proline accumulation in plants as response to osmotic stress. *Agrociencia (Montevideo)*. 3: 1-10.
- Dittrich, P., Mayer, M., and Meusel, M. (1979) Proton-stimulated opening of stomata in relation to chloride uptake by guard cells. *Planta*. 144: 305-309.
- Dregne, H. E. (1986) Desertification of arid lands. *Physics of desertification*. 4-34.
- Dregne, H. E. (2002) Land degradation in the drylands. *Arid Land Research and Management*. 16: 99-132.
- Dyson, T., and OGrada, C. (2002) Demography, food production and famine risks in the twenty-first century. *IDS Bulletin (Special issue: The 'new famines')*. 33: 108-113.
- Edreva, A. (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 106: 119-133.
- Enstone, D. E., Peterson, C. A., and Ma, F. S. (2002) Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. (Special issue: Root structure and function.). *Journal of Plant Growth Regulation*. 21: 335-351.
- Erstad, J. L. F. (1994) *Adaptation of woody plants to weather and climate in a maritime environment*. II. Salt and water stress. Norsk, Landbruksforskning. 8: 249-270.
- Estelle, M., (2002) Phenotypic Analysis of *Arabidopsis* Mutants: Auxin Hormone Response- How to Analyse a Mutant Phenotypically. Chapter 4, in *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Weigel and Glazebrook. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA.
- FAO. *Food and Agriculture Organization*. Disponible sur: <http://faostat.fao.org/>
- Farquhar, G. D., Schulze, E. D., and Koppers, M. (1980) Responses to humidity by stomata of *Nicotiana glauca* L. and *Corylus avellana* L. are consistent with the optimization of carbon dioxide uptake with respect to water loss. *Australian Journal of Plant Physiology*. 7: 315-327.

- Ferreira, I., Valancogne, C., and Silvestre, J. (1994) Stomatal and boundary layer resistances measured in fruit trees and vineyard. Proceedings of the third congress of the European Society for Agronomy, Padova University, Abano-Padova, Italy, 18-22 September 1994. 364-365.
- Finkelstein, A. (1987) *Water Movement through Lipid Bilayers, Pores, and Plasma Membranes: Theory and Reality*. Wiley, New York.
- Fooladmand, H. R. (2007) Improvement in estimation of soil-moisture characteristic curve based on soil particle size distribution and bulk density. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*. 11: 63-73.
- Forment, J., Gadea, J., Huerta, L., Abizanda, L., Agusti, J., Alamar, S., Alos, E., Andres, F., Arribas, R., Beltran, J. P., Berbel, A., Blazquez, M. A., Brumos, J., Canas, L. A., Cercos, M., Colmenero-Flores, J. M., Conesa, A., Estables, B., Gandia, M., Garcia-Martinez, J. L., Gimeno, J., Gisbert, A., Gomez, G., Gonzalez-Candelas, L., Granell, A., Guerri, J., Lafuente, M. T., Madueño, F., Marcos, J. F., Marques, M. C., Martinez, F., Martinez-Godoy, M. A., Miralles, S., Moreno, P., Navarro, L., Pallas, V., Perez-Amador, M. A., Perez-Valle, J., Pons, C., Rodrigo, I., Rodriguez, P. L., Royo, C., Serrano, R., Soler, G., Tadeo, F., Talon, M., Terol, J., Trenor, M., Vaello, L., Vicente, O., Vidal, C., Zacarias, L., and Conejero, V. (2005) Development of a Citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Molecular Biology*. 57:375–391.
- Fowler, M. R., Atanassova, A. I., Elliott, M. C., Scott, N. W., and Slater, A. (2000) Characterization of a Mak subgroup Cdc2-like protein kinase from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany*. 51: 2119-2124.
- Froelicher, Y., Dambier, D., Bassene, J. B., Costantino, G., Lotfy, S., Didout, C., Beaumont, V., Brottier, P., Risterucci, A. M., Luro, F., and Ollitrault, P. (2008) Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular Ecology Notes*. 8: 119-122.
- Fullen, M. A., and Catt, J. A. (2004) *Soil management: problems and solutions*. Hodder Arnold, London. 269p.
- Gao, X. Q., Li, C. G., Wei, P. C., Zhang, X. Y., Chen, J., and Wang, X. C. (2005) The dynamic changes of tonoplasts in guard cells are important for stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant Physiology*. 139: 1207-1216.
- Gao, J. P., Chao, D. Y., and Lin, H. X. (2007) Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress response in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*. 49: 742-750.
- Gao, X. J., and Giorgi, F. (2008) Increased aridity in the Mediterranean region under greenhouse gas forcing estimated from high resolution simulations with a regional climate model. *Global and Planetary Change*. 62: 195-209.

- Garrec, J. P., Henry, C., and Maout, L. (1995) Epi- and intracuticular waxes: their separation, chemical characteristics and role in cuticular permeability. *Environmental and Experimental Botany*. 35: 399-409.
- Gibson, U. E. M., Heid, C. A., and Williams, P. M. (1996) A novel method for real-time RT-PCR. *Genome Research*. 6: 995-1001.
- GIEC. *Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat*. Disponible sur : <http://www.greenfacts.org/fr/dossiers/changement-climatique/liens/giec.htm>
- Gomez-Cadenas, A., Tadeo, F., Talon, M., and Primo-Millo, E. (1996) Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed seedling of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiology*. 112: 401-408.
- Goyal, K., Walton, L. J., and Tunnacliffe, A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal*. 388: 151-157.
- Grace, J., Fasehun, F. E., and Dixon, M. (1980) Boundary layer conductance of the leaves of some tropical timber trees. *Plant, Cell and Environment*. 3: 443-450.
- Grant-Downton, R. T., and Dickinson, H. G. (2005) Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Annals of Botany*. 96: 1143-1164.
- Greenway, H., and Munns, R., (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 31: 149-190.
- Grieve, C. M., Wang, D., and Shannon, M. C. (2003) Salinity and irrigation method affect mineral ion relations of soybean. *Journal of Plant Nutrition*. 26: 901-913.
- Grillo, S., Leone, A., Xu, Y., Tucci, M., Francione, R., Hasegawa, P., M. Monti, L., and Bressan, R. A. (1995) Control of osmotin gene expression by ABA and osmotic stress in vegetative tissues of wild-type and ABA-deficient mutants of tomato. *Physiologia Plantarum*. 93: 498-504.
- Grosser, J. W., Ollitrault, P., and Olivares-Fuster, O. (2000) Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 36: 434-449.
- Grossnickle, S. C. (2005) Importance of root growth in overcoming planting stress. *New Forests*. 30: 273-294.
- Gulli, M., Rampino, P., Lupotto, E., Marmioli, N., and Perrotta, C. (2005) The effect of heat stress and cadmium ions on the expression of a small *hsp* gene in barley and maize. *Journal of Cereal Science*. 42: 25-31.
- Gulser, C. (2004) Determination of field capacity and permanent wilting point with pedotransfer functions related to soil physical and chemical properties. *Ondokuz Mays Universitesi, Ziraat Fakultesi Dergisi*. 19: 19-23.

- Guo, F. Q., and Tang, Z. C. (1999) Difference in Na^+ , K^+ accumulation in the salt-tolerant mutant and the wild type of wheat during exposure to NaCl stress. *Acta Botanica Sinica*. 41: 515-518.
- Guo, X. L., Liu, Z. H., Razzaq, Li, G. M. (2004) Drought-induced changes in xylem sap pH, ABA and stomatal conductance. *Agricultural Sciences in China*. 3: 496-501.
- Hagemann, R., and Berg, W. (1977) Comparative analysis of paramutation systems in higher plants. *Biologische Zentralblatt*. 96: 257-302.
- Hallam, N. D. (1982) *Fine structure of the leaf cuticle and the origin of leaf waxes*. The plant cuticle, Edward Arnold, London, 197-214.
- Hartung, W., and Radin, J. W. (1989) Absciscic acid in the mesophyll apoplast and in the xylem sap of water-stressed plants: the significance of pH gradients. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*. 8: 110-124.
- Hartung, W., Slovik, S., and Baier, M. (1990) pH changes and redistribution of absciscic acid within the leaf under stress. *Monograph - British Society for Plant Growth Regulation*. 21: 215-236.
- Hartung, W., Wilkinson, S., and Davies, W. J. (1998) Factors that regulate absciscic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *Journal of Experimental Botany*. 49: 361-367.
- Hartung, W., Sauter, A., and Hose, E. (2002) Absciscic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany*. 53: 27-32.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., and Bonhert, H. J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 463-499.
- Hattori, T., Totsuka, M., Hobo, T., Kagaya, Y., and Yamamoto-Toyoda, A. (2002) Experimentally determined sequence requirement of ACGT-containing absciscic acid response element. *Plant and Cell Physiology*. 43: 136-140.
- Havaux, M., Tardy, F., Ravenel, J., Chanu, D., and Parot, P. (1996) Thylakoid membrane stability to heat stress studied by flash spectroscopic measurements of the electrochromic shift in intact potato leaves: influence of the xanthophyll content. *Plant, Cell and Environment*. 19: 1359-1368.
- Houerou, H. N. (1993) Climatic changes and desertification. *Secheresse*. 4: 95-111.
- Heidari, M., and Mesri, F. (2008) Salinity effects on compatible solutes, antioxidants enzymes and ion content in three wheat cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11: 1385-1389.
- Hernandez, J. A., Olmos, E., Corpas, F. J., Sevilla, F., and Rio, L. A. (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science (Limerick)*. 105: 151-167.

- Horton, P., Ruban, A. V., and Walters, R. G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47: 655-684.
- Horvath, A., Upham, B. L., Ganev, V., and Trosko, J. E. (2002) Determination of the epigenetic effects of ochratoxin in a human kidney and a rat liver epithelial cell line. *Toxicon*. 40: 273-282.
- Houben, A., Demidov, D., Gernand, D., Meister, A., Leach, C. R., and Schubert, I. (2003) Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant Journal*. 33: 967-973.
- Hsiao, T. C. (1979) Plant response to water deficits, efficiency, and drought resistance. *Agricultural Meteorology*. 14: 59-84.
- Huang, S. B., Spielmeier, W., Lagudah, E. S., and Munns, R. (2008) Comparative mapping of *HKT* genes in wheat, barley, and rice, key determinants of Na⁺ transport, and salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 59: 927-937.
- Huang, B. R., and Xu, C. P. (2008) Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. (Special Issue: Understanding abiotic stresses and the solution.). *Journal of Integrative Plant Biology*. 50: 1230-1237.
- Huck, M. G. (1984) *Water flux in the soil-root continuum. Roots, nutrient and water influx, and plant growth*. ASA Special Publication, S.A. Barber and D. R. Bouldin, American Society of Agronomy. 47-63.
- Hubbard, K. E., Hotta, C. T., Gardner, M. J., Baek SoengJin Dalchau, N., Dontamala, S., Dodd, A. N., and Webb, A. A. R. (2007) *Circadian rhythms in stomata: physiological and molecular aspects. Rhythms in plants: phenomenology, mechanisms, and adaptive significance*. Springer, Berlin, Heidelberg. 157-177.
- Huh, J. H., Bauer, M. J., Hsieh, T. F., and Fischer, R. L. (2008) Cellular programming of plant gene imprinting. *Cell (Cambridge)*. 132: 735-744.
- Humbert, C., and Guyot, M. (1982) Guard cell vacuoles and stomatal movements. *Physiologie Vegetale*. 20: 239-246.
- Hutchinson, D.J., and Barrett H.C. (1982) Tetraploid frequency in nucellar seedlings from single trees of Carrizo and Troyer hybrids. *Proceeding International Society of Citriculture*. 1: 27-29.
- Iba, K., Gibson, S., Nishiuchi, T., Fuse, T., Nishimura, M., Arondel, A., Hugly, S., and Somerville, C. (1993) A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 24099-24105.
- Ibanez, J., Martinez, J., and Schnabel, S. (2007) Desertification due to overgrazing in a dynamic commercial livestock-grass-soil system. *Ecological Modelling*. 205: 277-288.

- Ikegami, K., Okamoto, M., Seo, M., and Koshiba, T. (2009) Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. *Journal of Plant Research*. 122: 235-243.
- IPCC. *Intergovernmental Panel on Climate Change*. Disponible sur: <http://www.ipcc.ch/>
- Irada, M. G., Saftar, Y. S., and Jalal A. A. (2005) The effect of norflurazon on protein composition and chlorophyll organization in pigment-protein complex of Photosystem II. *Photosynthesis Research*. 84: 71-76.
- Isoda, A., Aboague, L. M., Nojima, H., and Takasaki, Y. (1996) Effects of leaf movement on radiation interception in field grown leguminous crops. IV. Relation to leaf temperature and transpiration among peanut cultivars. *Japanese Journal of Crop Science*. 65: 700-706.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 27: 325-333.
- Jang, C. S., Lee, H. J., Chang, S. J., and Seo, Y. W. (2004) Expression and promoter analysis of the *TaLTP1* gene induced by drought and salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*. 167: 995-1001.
- Jarvis, A. J., Mansfield, T. A., and Davies, W. J. (1999) Stomatal behaviour, photosynthesis and transpiration under rising CO₂. *Plant, Cell and Environment*. 22: 639-648.
- Jenks, M. A., Eigenbrode, S., and Lemeiux, B. (2002) Cuticular waxes of *Arabidopsis*. In the *Arabidopsis Book*, C. Somerville and E. Meyerowitz, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. Disponible sur: <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Jodo, S. (1973) Stomatal movement and water relations in crops. 2. Stomatal behaviour of tobacco leaves of different ages and the influence of soil water shortage. *Proceedings of the Crop Science Society of Japan*. 42: 123-130.
- Johnson-Flanagan, A. M., and Singh, J. (1986) Membrane deletion during plasmolysis in hardened and non-hardened plant cells. *Plant, Cell and Environment*. 9: 299-305.
- Jung, S. (2004) Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 225-231.
- Kabaa, K., and Kobus, G. (2005) Plant Ca²⁺-ATPases. *Acta Physiologiae Plantarum*. 27: 559-574.
- Kagaya, Y., Hobo, T., Murata, M., Ban, A., and Hattori, T. (2002) Absciscic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell*. 14: 3177-3189.

- Kaiser, H., and Legner, N. (2007) Localization of mechanisms involved in hydropassive and hydroactive stomatal responses of *Sambucus nigra* to dry air. *Plant Physiology*. 143: 1068-1077.
- Kalifa, Y., Perlson, E., Gilad, A., Konrad, Z., Scolnik, P. A., and Bar-Zvi, D. (2004) Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant, Cell and Environment*. 27: 1459-1468.
- Kamel, M., and El-Tayeb, M. A. (2004) K^+/Na^+ soil-plant interactions during low salt stress and their role in osmotic adjustment in faba beans. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2: 257-265.
- Karahara, I., Ikeda, A., Kondo, T., and Uetake, Y. (2004) Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta*. 219: 41-47.
- Katerji, N., Hoorn, J. W., van Hamdy, A., and Mastrorilli, M. (2000) Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. *Agricultural Water Management*. 43: 99-109.
- Kaviani, B. (2008) Proline accumulation and growth of soybean callus under salt and water stress. *International Journal of Agriculture and Biology*. 10: 221-223.
- Kawasaki, S., Brochert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. W., and Bohnert, H. J. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*. 13: 889-906.
- Kellogg, E. A. (2003) What happens to genes in duplicated genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 4369-4371.
- Kholodova, V. P., Bolyakina, Y. P., Meshcheryatov, A. B., Richter, E., Ehwald, R., Mashkova, A. K., and Pechenova, T. V. (1987) Structural and functional aspects of transport in roots. Third international symposium on structure and function of roots, Nitra, Czechoslovakia, 3-7 Aug. 1987. 79-84.
- Kim, K. M., and Portis, A. R. (2005) Temperature dependence of photosynthesis in *Arabidopsis* plants with modifications in Rubisco activase and membrane fluidity. *Plant and Cell Physiology*. 46: 522-530.
- Kinoshita, T., Nishimura, M., and Shimazaki, K. I. (1995) Cytosolic concentration of Ca^{2+} regulates the plasma membrane H^+ -ATPase in guard cells of fava bean. *Plant Cell*. 7: 1333-1342.
- Kirkham, M. B. (2002) The concept of the soil-plant-atmosphere continuum and applications. Environmental mechanics: water, mass and energy transfer in the biosphere. *Geophysical Monograph Series*. 129: 327-335.
- Kizis, D., and Pages, M. (2002) Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant Journal*. 30: 679-689.

- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A., and Hattori, T. (2005) Absciscic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant Journal*. 44: 939-949.
- Kobayashi, F., Ishibashi, M., and Takumi, S. (2008) Transcriptional activation of *Cor/Lea* genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat *DREB2* homolog in transgenic tobacco. *Transgenic Research*. 17: 755-767.
- Kondo, M., Murty, M. V. R., and Aragones, D. V. (2000) Characteristics of root growth and water uptake from soil in upland rice and maize under water stress. *Soil Science and Plant Nutrition*. 46: 721-732.
- Koyro, H. W., Daoud, S., Harrouni, C., and Huchzermeyer, B. (2006) Strategies of a potential cash crop halophyte (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) to avoid salt injury. *Tropical Ecology*. 47: 191-200.
- Kremer, M. (1993) Population Growth and Technological Change: One Million B.C. to 1990. *The Quarterly Journal of Economics*. 108: 681-716.
- Koringa, P. G., Makadiya, N. R., and Rakhi S. (2007) The facts behind X chromosome inactivation. *Veterinary World*. 5: 258-262.
- Kouskouti, A., and Talianidis, I. (2005) Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *EMBO Journal*. 24: 347-357.
- Koyro, H. W., Daoud, S., Harrouni, C., and Huchzermeyer, B. (2006) Strategies of a potential cash crop halophyte (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) to avoid salt injury. *Tropical Ecology*. 47: 191-200.
- Krug, C. A. (1943) Chromosome numbers in the subfamily Aurantioideae, with special reference in the genus Citrus. *Citrus Botanical Gazette*. 104: 602-611.
- Kubiczek, S. A. (1978) The mechanism for bending the walls of guard cells during the functioning of stomata in *Tradescantia virginiana*. *Fiziologiya Rastenii*. 25: 323-327.
- Kurz, M. (2008) Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers. (Review). *Saline Systems*. 46.
- Kusumoto, D., Chae, S. H., Mukaida, K., Yoneyama, K., Yoneyama, K., Joel, D. M., and Takeuchi, Y. (2006) Effects of fluridone and norflurazon on conditioning and germination of *Striga asiatica* seeds. *Plant Growth Regulation*. 48: 73-78.
- Lacointe, A., and Minchin, P. E. H. (2008) Modelling phloem and xylem transport within a complex architecture. *Functional Plant Biology*. 35: 772-780.
- Lamb, J. C., Yu, W., Han, F., and Birchler, J. A. (2008) Plant centromeres. *Plant genomes*. 4: 95-107.

- Lapina, L. P., Sogolova, T. V., and Strogonov, B. P. (1980) Localization of chlorine in glycophytes and halophytes under conditions of salinization. *Fiziologiya Rastenii*. Secondary Source: (*Soviet Plant Physiology* 27, 212-220 [En].). 27: 278-286.
- Latif, M., and Ilyas, M. (1990) A model for soil profile salt distribution in crop root zone. Soil physics - application under stress environments. Proceedings of the International Symposium on Applied Soil Physics in Stress Environments, 22-26 January 1989. Islamabad, Pakistan, 386-398.
- Levin, A., Shaviv, A., and Indelman, P. (2007) Influence of root resistivity on plant water uptake mechanism, Part II: Analytical solutions for low/moderate soil-root conductivity ratio. *Transport in Porous Media*. 70: 81-95.
- Levy, A. A., and Feldman, M., (2004) Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biological Journal of Linneage Society*. 82: 607-613.
- Lima-Costa, M. E., Ferreira, A. L., Duarte, A., and Beltrao, J. (2002) Saline stress and cell toxicity evaluation using suspended plant cell cultures of horticultural crops grown in a bioreactor. *Acta Horticulturae*. 573: 219-225.
- Liu, B., and Wendel, J. F. (2003) Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29: 365-379.
- Liu, X. Y., Yang, J. H., Li, B., Yang, X. M., Meng, Q. W. (2006) Antisense-mediated depletion of tomato chloroplast omega-3 fatty acid desaturase enhances thermal tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48: 1096-1107.
- Long, S. P., Humphries, S., and Falkowski, P. G. (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 45: 633-662.
- Longley, A. E. (1925) Polycary, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. *Journal of the Washington Academy of Science*. 15: 347-351.
- Lu, P., Zhang, S. Q., Outlaw, W. H., and Jr. Riddle, K. A. (1995) Sucrose: a solute that accumulates in the guard-cell apoplast and guard-cell symplast of open stomata. *FEBS Letters*. 362: 180-184.
- Lu, P., Outlaw, W. H., Jr. Smith, B. G., and Freed, G. A. (1997) A new mechanism for the regulation of stomatal aperture size in intact leaves. Accumulation of mesophyll-derived sucrose in the guard-cell wall of *Vicia faba*. *Plant Physiology*. 114: 109-118.
- Lv, S. L., Zhang, K. W., Gao, Q. A., Lian, L. J., Song, Y. J., and Zhang, J. R. (2008) Overexpression of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* in cotton enhances salt tolerance and improves growth and photosynthetic performance. *Plant and Cell Physiology*. 49: 1150-1164.
- Lysak, M. A., Pecinka, A., and Schubert, I. (2003) Recent progress in chromosome painting of Arabidopsis and related species. *Chromosome Research*. 11: 195-204.

- Ma, F. S., and Peterson, C. A. (2003) Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Canadian Journal of Botany*. 81: 405-421.
- Ma, C., Zhang, W. H., and Liu, X. C. (2008) Effects of iso-osmotic potential salt and water stress on the seed germination of *Periploca*. *Bulletin of Botanical Research*. 28: 465-470.
- MacCabe, J., Shelp, S., and Ursino, D. J. (1979) Photosynthesis and photophosphorylation in radiation-stressed soybean plants and the relation of these processes to photoassimilate export. *Environmental and Experimental Botany*. 19: 253-261.
- MacKay, I. M., Arden, K. E., and Nitsche, A. (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*. 30: 1292-1305.
- MacRobbie, E. A. C. (2006) Control of volume and turgor in stomatal guard cells. (Thematic Issue: The Control of Fluid Transport in Tissues and Cells). *Journal of Membrane Biology*. 210: 131-142.
- Mademba-Sy, F. (2004). Contribution à la recherche d'indicateurs physiologiques et biochimiques de la tolérance des agrumes à la salinité. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1. 164p.
- Maggio, A., and Joly, R. J. (1995) Effects of mercuric chloride on the hydraulic conductivity of tomato root systems: Evidence for a channel-mediated water pathway. *Plant Physiology*. 109: 331-335.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., and Oda, K. (2004) *warf and delayed-flowering 1*, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant Journal*. 37: 720-729.
- Mahajan, S., Pandey, G. K., and Tuteja, N. (2008) Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 471: 146-158.
- Mahdieh, M., Mostajeran, A., Horie, T., and Katsuhara, M. (2008) Drought stress alters water relations and expression of *PIP*-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant and Cell Physiology*. 49: 801-813.
- Malcolm, C. V., Lindley, V. A., O'Leary, J. W., Runciman, H. V., and Barrett-Lennard, E. G. (2003) Halophyte and glycophyte salt tolerance at germination and the establishment of halophyte shrubs in saline environments. (Special Issue: Waterlogging and salinity tolerance.) *Plant and Soil*. 253: 171-185.
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A., and Marion-Poll, A. (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the *ABA* locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Journal*. 15: 2331-2342.

- Marlet, S., Barbiero, L., and Valles, V. (1998) Soil alkalization and irrigation in the Sahelian zone of Niger II: agronomic consequences of alkalinity and sodicity. *Arid Soil Research and Rehabilitation*. 12: 139-152.
- Martelotto, L. G., Ortiz, J. P. A., Stein, J., Espinoza, F., Quarin, C. L., and Pessino, S. C. (2007) Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum* sp. *Plant Science*. 172: 970-977.
- Martienssen, R. A. (1996) Epigenetic phenomena: paramutation and gene silencing in plants. *Current Biology*. 6: 810-813.
- Martienssen, R. A., and Colot, V. (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science (Washington)*. 293: 1070-1074.
- Martin, T. A., Hinckley, T. M., Meinzer, F. C., and Sprugel, D. G. (1999) Boundary layer conductance, leaf temperature and transpiration of *Abies amabilis* branches. *Tree Physiology*. 19: 435-443.
- Martinez-Godoy, M. A., Mauri, N., Juarez, J., Marques, M. C., Santiago, J., Forment, J., and Gadea, J. (2008) A genome-wide 20K citrus microarray for gene expression analysis. *BMC Genomics*. 9: 318.
- Martre, P., Morillon, R., Barrieu, F., North, G. B., Nobel, P. S., and Chrispeels, M. J. (2002) Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology*. 130: 2101-2110.
- Masterson, J. (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science (Washington)*. 264: 421-424.
- Matsumura, T., Kanechi, M., Inagaki, N., and Maekawa, S. (1998) The effects of salt stress on ion uptake, accumulation of compatible solutes, and leaf osmotic potential in safflower, *Chrysanthemum paludosum* and sea aster. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 67: 426-431.
- Matzke, M., Mette, M. F., Jakowitsch, J., Kanno, T., Moscone, E. A., Winden, J., and van der Matzke, A. J. M. (2001) A test for transvection in plants: DNA pairing may lead to *trans*-activation or silencing of complex heteroalleles in tobacco. *Genetics*. 158: 451-461.
- Maxwell, K., and Johnson, G. N., (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experiment Botany*. 51: 659-668.
- Meehan, L., Harkins, K., Chory, J., and Rodermel, S. (1996) Lhcb Transcription Is Coordinated with Cell Size and Chlorophyll Accumulation (Studies on Fluorescence-Activated, Cell-Sorter-Purified Single Cells from Wild-Type and immutans *Arabidopsis thaliana*). *Plant Physiology*. 112: 953-963.
- Meidner, H. (1975) Water supply, evaporation, and vapour diffusion in leaves. *Journal of Experimental Botany*. 26: 666-673.

- Meins, F. (1996) Epigenetic modifications and gene silencing in plants. Epigenetic mechanisms of gene regulation. 1: 415-442.
- Melis, A. (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: What modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends in Plant Science*. 4: 130-135.
- Mendez-Romero, F., Gisbert-Blanquer, J., Garcia-Diaz, J., and Marques-Mateu, A. (2005) State of the contamination by heavy metals in soils irrigated with waste water in the Huerta of Valencia (Spain). *Agrochimica*. 49: 10-21.
- Milborrow, B. V. (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. 52: 1145-1164.
- Mishra, G., Zhang, W. H., Deng, F., Zhao, J., and Wang, X. M. (2006) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science (Washington)*. 312: 264-266.
- Mishra, A., Khare, S., Trivedi, P. K., and Nath, P. (2008) Ethylene induced cotton leaf abscission is associated with higher expression of cellulase (GhCell1) and increased activities of ethylene biosynthesis enzymes in abscission zone. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46:54-63.
- Moomen, S. E., and Barney, C. W. (1981) A modern technique to halt desertification in the Libyan Jamahiriya. *Agricultural Meteorology*. 23: 131-136.
- Morillon, R., and Chrispeels, M. J., (2001) The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cell. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*. 98: 14138-14143.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., and Wittwer, C. T. (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 24: 954-962.
- Morton, N., Dickerson, A. G., and Hammond, J. B. W. (1985) Mannitol metabolism in *Agaricus bisporus*: purification and properties of mannitol dehydrogenase. *Journal of General Microbiology*. 131: 2885-2890.
- Mouhaya, W. (2008) Caractérisation physiologique et moléculaire de la tolérance au stress salin chez les porte-greffe tétraploïdes d'agrumes. Thèse de Doctorat, Université de Corse-Pascal Paoli, Corte. 202p.
- Moya, J. L., Gomez-Cadenas, A., Primo-Millo, E., and Talon., M. (2003) Chloride tolerance in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water usage. *Journal of Experimental Botany*. 383: 825-833.
- Müller, P., Li, X. P., and Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching: A response to excess light energy. *Plant Physiology*. 125: 1558-1566.

- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. (Special issue: Drought stress). *Plant, Cell and Environment*. 25: 239-250.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., and Allakhverdiev, S. I. (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetics*. 1767: 414-421.
- Nakayama, K., Okawa, K., Kakizaki, T., and Inaba, T. (2008) Evaluation of the protective activities of a late embryogenesis abundant (LEA) related protein, Cor15am, during various stresses *in vitro*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 72: 1642-1645.
- Narita, Y., Taguchi, H., Nakamura, T., Ueda, A., Shi, W., and Takabe, T. (2004) Characterisation of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves. *Plant Science*. 167: 1009-1016.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z. K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant Journal*. 34: 137-148.
- NASA. *National Aeronautics and Space Administration*. Disponible sur: <http://www.nasa.gov/>
- Nelissen, H., Boccardi, T. M., Himanen, K., and van Lijsebettens, M. (2007) Impact of core histone modifications on transcriptional regulation and plant growth. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 26: 243-263.
- Neuhaus, H. E. (2007) Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. (Special issue: Plant transporters and channels.). *FEBS Letters*. 581: 2223-2226.
- Ni, Z., Kim, E. D., Ha, M., Lackey, E., Liu, J. X., Zhang, Y., Sun, Q. X., and Chen, Z. J. (2009) Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature*. 457: 327-331.
- Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., and Pardo, J. M. (1995) Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*. 109: 735-742.
- Nobel, P. S. (1999) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. 2nd ed. Academy Press, San Diego, CA.
- Noorbakhsh, F., and Afyuni, M. (2000) Estimation of field capacity and permanent wilting point from some soil physical and chemical properties. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*. 4: 1-9.
- Ogawa, A., and Yamauchi, A. (2006) Root osmotic adjustment under osmotic stress in maize seedlings. 1. Transient change of growth and water relations in roots in response to osmotic stress. *Plant Production Science*. 9: 27-38.

- Ollitrault, P., Dambier, D., and Luro, F. (1996) Somatic hybridization in Citrus: some new hybrids and alloplasmic plants. *Proceeding of International Society of Citriculture*. 2: 907-912.
- Ollitrault, P., Froelicher, Y., Dambier, D., and Seker, M. (2000) Rootstock breeding by somatic hybridisation for the Mediterranean citrus industry. *Acta Horticulturae*. 157-162.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Luro, F., and Froelicher, Y. (2008) Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant Breeding Review*. 30: 323-352.
- ONU. *Organisation des Nations Unies*. Disponible sur: <http://www.un.org/fr/>
- Oparka, K. J., Prior, D. A. M., and Crawford, J. W. (1994) Behaviour of plasma membrane, cortical ER and plasmodesmata during plasmolysis of onion epidermal cells. *Plant, Cell and Environment*. 17: 163-171.
- Orzepowski, W., and Pulikowski, K. (2008) Magnesium, calcium, potassium and sodium content in groundwater and surface water in arable lands in the commune (*Gmina*) of Katy Wrocawskie. *Journal of Elementology*. 13: 605-614.
- Osborn, T. C., Chris, J. C., Birchler, J. A., Auger, D. L., Chen, Z. J., Lee, H. S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R. W., Colot, V., and Martienssen R. A. (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics*. 19: 141-147.
- Otto, S. P., and Whitton, J. (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*. 34: 401-437.
- Ownbey, R. S., and Mahall, B. E. (1983) Salinity and root conductivity: differential responses of a coastal succulent halophyte, *Salicornia virginica*, and a weedy glycophyte, *Raphanus sativus*. *Physiologia Plantarum*. 57: 189-195.
- Pachauri, R. K., and Resinger A. (2007) Climate change 2007: the AR4 synthesis report. IPCC. Geneva, Switzerland.
- Pakendorf, K. W., Schalkwyk, D. J., and van Coetzer, F. J. (1973) Mineral element accumulation in *Lupinus*. 2. Variation of mineral element concentration in plant components and growth stages of various lupin species. *Zeitschrift fur Acker- und Pflanzenbau*. 138: 46-62.
- Palta, J. P., and Lee-Stadelmann, O. Y. (1983) Vacuolated plant cells as ideal osmometer: reversibility and limits of plasmolysis, and estimation of protoplasm volume in control and water-stress-tolerant cells. *Plant, Cell and Environment*. 6: 601-610.
- Panning, B., and Jaenisch, R. (1998) RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell (Cambridge)*. 93: 305-308.
- Park, B. J., Liu, Z. C., Kanno, A., and Kameya, T. (2005) Increased tolerance to salt- and water-deficit stress in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) by constitutive expression of LEA. *Plant Growth Regulation*. 45: 165-171.

- Parks, G. E., Dietrich, M. A., and Schumaker, K. S. (2002) Increased vacuolar Na^+/H^+ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1055-1065.
- Pascual, J. A., Ano, C., Valera, A., Poyatos, M., and Sanchez, J. (2005) Urban growth (1956-1998) and soil degradation in the municipality of Valencia, Spain. *Advances in Geoecology*. 36: 347-354.
- Passioura, J. B. (1982) Water in the soil-plant-atmosphere continuum. II. Water relations and carbon assimilation. *Physiological plant ecology*. 5-33.
- Paterson, A. H. (2005) Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation. (Special Issue: Genetics of adaptation.) *Genetica*. 123: 191-196.
- Peng, Y. H., Zhu, Y. F., Mao, Y. Q., Wang, S. M., Su, W. A., and Tang, Z. C. (2004) Alkali grass resists salt stress through high $[\text{K}^+]$ and an endodermis barrier to Na^+ . *Journal of Experimental Botany*. 55: 939-949.
- Penterman, T., Huh, J. H., Hsieh, T. F., and Fischer, R. L. (2007) Genomic imprinting in *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. Endosperm: developmental and molecular biology. *Plant Cell Monographs*. 8: 219-239.
- Petcu, E., Arsintescu, A., and Stanciu, D. (2003) Studies regarding the hydric stress effect on sunflower plants. *Analele Institutului de Cercetari pentru Cereale si Plante Tehnice, Fundulea*. 70: 347-356.
- Peisker, M. (1973) CO_2 uptake, transpiration and leaf temperature as influenced by changes in stomatal aperture. *Kulturpflanze*. 21: 97-109.
- Pereira, M. R. R., Klar, A. E., Melhoranca Filho, A. L., Rodrigues, A. C. P., and Silva, M. R. (2008) Different soil hydric deficit and texture influence on *Eucalyptus urograndis* plants. *IRRIGA*. 13: 249-260.
- Pfluger, J., and Wagner, D. (2007) Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Current Opinion in Plant Biology (Special Issue: Cell Biology)*. 10: 645-652.
- Pharr, D. M., Prata, R. T. N., Jennings, D. B., Williamson, J. D., Zamski, E., Yamamoto, Y. T., and Conkling, M. A. (1999) Regulation of mannitol dehydrogenase: relationship to plant growth and stress tolerance. *HortScience*. 34: 1027-1032.
- Pitts, R. J., Cernac, A., and Estelle, M. (1998) Auxin and ethylene promote root hair elongation in Arabidopsis. *Plant Journal*. 16: 553-560.
- Polyakov, M. A., and Karpushkin, L. T. (1981) Air humidity above the evaporating surface of leaf mesophyll cells. 2. Analysis of the possible reasons for air humidity decrease. *Fiziologiya Rastenii*. 28: 448-460.
- Pottosin, I. I., and Muniz, J. (2002) Higher plant vacuolar ionic transport in the cellular context. *Acta Botanica Mexicana*. 60: 37-77.

- Praloran, J. C., (1971) *Les Agrumes*. Techniques agricoles et Productions tropicales. R. Coste, G. P. Maisonneuve et Laroste. Paris, France. 565p.
- Prata, R. T. N., Williamson, J. D., Conkling, M. A., and Pharr, D. M. (1997) Sugar repression of mannitol dehydrogenase activity in celery cells. *Plant Physiology*. 114: 307-314.
- Pratt, R. B., Jacobsen, A. L., Ewers, F. W., and Davis, S. D. (2007) Relationships among xylem transport, biomechanics and storage in stems and roots of nine Rhamnaceae species of the California chaparral. *New Phytologist*. 174: 787-798.
- Qi, Z., and Spalding, E. P. (2004) Protection of plasma membrane K^+ transport by the salt overly sensitive Na^+-H^+ antiporter during salinity stress. *Plant Physiology*. 136: 2548-2555.
- Qian, H., and Liu, Y. L. (1995) Protective effect of Ca^{2+} on plasma membranes and tonoplasts from barley roots under salt stress. *Plant Physiology Communications*. 31: 102-104.
- Qin, G., Gu, H. G., Ma, L. G., Peng, Y. B., Deng, X. W., Chen, Z. G., and Qu, L. J. (2007) Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Research*. 17: 471-482.
- Quintero, F. J., Blatt, M. R., and Pardo, J. M. (2000) Functional conservation between yeast and plant endosomal Na^+/H^+ antiporters. *FEBS Letters*. 471: 224-228.
- Radin, J. W., Mauney, J. R., and Kerridge, P. C. (1989) Water uptake by cotton roots during fruit filling in relation to irrigation frequency. *Crop Science*. 29: 1000-1005.
- Radyukina, N. L., Kartashov, A. V., Ivanov, Y. V., Shevyakova, N. I., and Kuznetsov, V. V. (2007) Functioning of defense systems in halophytes and glycophytes under progressing salinity. *Russian Journal of Plant Physiology*. 54: 806-815.
- Raeini-Sarjaz, M., and Chalavi, V. (2008) Pulvinus activity, leaf movement and leaf water-use efficiency of bush bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a hot environment. *International Journal of Biometeorology*. 52: 815-822.
- Raschke, K., Shabahang, M., and Wolf, R. (2003) The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: Their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO_2 . *Planta*. 217: 639-650.
- Rassoulzadegan, M., Magliano, M., and Cuzin, F. (2002) Transvection effects involving DNA methylation during meiosis in the mouse. *EMBO Journal*. 21: 440-450.
- Rausch, T., Kirsch, M., Low, R., Lehr, A., Viereck, R., and Zhigang, A. (1996) Salt stress responses of higher plants: the role of proton pumps and Na^+/H^+ -antiporters. *Journal of Plant Physiology*. 148: 425-433.
- Rawls, W. J. (1983) Estimating soil bulk density from particle size analysis and organic matter content. *Soil Science*. 135: 123-125.

- Ren, L. L., and Gao, H. Y. (2008) Effects of NaCl stress on induction of photosynthesis and PS II photochemistry efficiency of *Rumex* K-1 leaves with different age. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 28: 1014-1019.
- Rey Benayas, J. M., Martins, A., Nicolau, J. M., and Schulz, J. J. (2007) Abandonment of agricultural land: an overview of drivers and consequences. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. 14: 2-57.
- Rhoades, J. D., Kandiah, A., and Mashali, A.M. (1992) *The use of saline waters for crop production*. FAO irrigation and drainage. FAO, Rome. 48p.
- Richu Singla Jitendra Singh Kumar, D. (2007) Heat shock proteins (HSPs) and acquisition of thermo tolerance in higher plants. *International Journal of Plant Sciences (Muzaffarnagar)*. 2: 252-257.
- Riddle, N. C., and Richards, E. J. (2005) Genetic variation in epigenetic inheritance of ribosomal RNA gene methylation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 41: 524-532.
- Riera, M., Valon, C., Fenzi, F., Giraudat, J., and Leung, J. (2005) The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signalling components. (Special Issue: Signalling Cross Talk). *Physiologia Plantarum*. 123: 111-119.
- Ristic, Z., and Jenks, M. A. (2002) Leaf cuticle and water loss in maize lines differing in dehydration avoidance. *Journal of Plant Physiology*. 159: 645-651.
- Ristic, Z., Bukovnik, U., and Prasad, P. V. V. (2007) Correlation between heat stability of thylakoid membranes and loss of chlorophyll in winter wheat under heat stress. *Crop Science*. 47: 2067-2073.
- Ritchies, J. C., and Haynes, C. V. (1987) Holocene vegetation zonation in the eastern Sahara. *Nature*. 330: 645-647.
- Roelfsema, M. R. G., and Hedrich, R. (2002) Studying guard cells in the intact plant: modulation of stomatal movement by apoplastic factors. (Special issue: Stomata). *New Phytologist*. 153: 425-431.
- Romero, C., Belles, J. M., Vaya, J. L., Serrano, R., and Culianez-Macia, F. A. (1997) Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*. 201: 293-297.
- Rozanov, B. G. (1977) Problems of the degradation of the dry lands of the world and international cooperation in the control of desertification. *Pochvovedenie*. 8: 5-11.
- Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B. H., Matsumoto, T. K., Koiwa, H., Zhu, J. K., Bressan R. A., and Hasegawa, P. M. (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. 98: 14150-14155.

- Sade, N., Vinocur, B. J., Diber, A., Shatil, A., Ronen, G., Nissan, H., Wallach, R., Karchi, H., and Moshelion, M. (2009) Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytologist*. 181: 651-661.
- Salama, Z. A., Fawzi, A. F. A., and Ghanem, S. A. (2002) Growth, nutrient uptake and antioxidant levels in salinized wheat plants. *Egyptian Journal of Physiological Sciences*. 24: 1.
- Saleh, B. (2005) Contribution à l'étude des déterminants physiologiques, génétiques et moléculaires de la tolérance des agrumes à la salinité, Thèse de doctorat, Université Montpellier II, Montpellier. 192p.
- Saleh, B., Allario, T., Dambier, D., Ollitrault, P., and Morillon, R. (2008) Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Comptes Rendus Biologie*, 331: 703-710.
- Salvucci, M. E., and Crafts-Brandner, S. J. (2004) Mechanism for deactivation of Rubisco under moderate heat stress. *Physiologia Plantarum*. 122: 513-519.
- Samuels, L., Kunst, L., and Jetter, R. (2008) Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 683-707.
- Sanchez, F. J., Manzanares, M., Andres, E. F., de Luis Tenorio, J., and Ayerbe, L. (2001) Residual transpiration rate, epicuticular wax load and leaf colour of pea plants in drought conditions. Influence on harvest index and canopy temperature. *European Journal of Agronomy*. 15: 57-70.
- Sanchez-Damas, J. J., Avitia-Garcia, E., Castillo-Gonzalez, A. M., Villegas-Monter, A., and Corona-Torres, T. (2006) Anatomical study of polyembryony in three citrus rootstocks. Revista Chapingo. *Serie Horticultura*. 12: 145-152.
- Sanjay Singh Singh, T. N. (1999) Root growth of wheat in simulated vertical and lateral splits of layered salt profiles in soil. *Indian Journal of Plant Physiology*. 4: 73-78.
- Sarge, K. D., and Park-Sarge, O. K. (2005) Gene bookmarking: keeping the pages open. *Trends in Biochemical Sciences*. 30: 605-610.
- Sato, Y., and Yokoya, S. (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Reports*. 27: 329-334.
- Sauter, A., Davies, W. J., and Hartung, W. (2001) The long distance abscisic acid signal in the droughted plant: The fate of the hormone on its way from the root to the shoot. *Journal of Experimental Botany*. 52: 1-7.
- Schachtman, D. P., and Goodger, J. Q. D. (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*. 13: 281-287.
- Schäffner, A. R. (1998) Aquaporin function, structure, and expression: Are there more surprises to surface in water relations? *Planta*. 204: 131-139.

- Schleiff, U. (1982) Salt dynamics in root-containing soil and its significance for the water supply of crops. *Zeitschrift für Kulturtechnik und Flurbereinigung*. 23: 38-49.
- Schmidhalter, U., Burucs, Z., and Camp, K. H. (1998) Sensitivity of root and leaf water status in maize (*Zea mays*) subjected to mild soil dryness. *Australian Journal of Plant Physiology*. 25: 307-316.
- Schrader, S. M., Wise, R. R., Wacholtz, W. F., Ort, D. R., and Sharkey, T. D. (2004) Thylakoid membrane responses to moderately high leaf temperature in Pima cotton. *Plant, Cell and Environment*. 27: 725-735.
- Schuster, M., Düringer, P., Ghienne, J. F., Vignaud, P., Mackaye H. T., Likius, A., and Brunet, M. (2006) The Age of the Sahara Desert. *Science*, 311: 821.
- Seker, M., Tuzcu, O., and Ollitrault, P. (2002) Comparison of nuclear DNA content of citrus rootstock populations by flow cytometry analysis. *Plant Breeding*. 122: 169-172.
- Seo, M., Aoki, H., Koiwai, H., Kamiya, Y., Nambara, E., and Koshiba, T. (2004) Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. *Plant and Cell Physiology*. 45: 1694-1703.
- Shabala, S., and Cuin, T. A. (2006) Osmoregulation versus osmoprotection: re-evaluating the role of compatible solutes. (Advances and Topical Issues, Volume I). *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. 1: 405-416.
- Shan, L., and Li, L. (2008) Carotenoid Metabolism: Biosynthesis, Regulation, and Beyond. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50: 778-785.
- Sharma, P. K., and Hall, D. O. (1991) Interaction of salt stress and photoinhibition on photosynthesis in barley and sorghum. *Journal of Plant Physiology*. 38: 614-619.
- Sheikh, B. A., and Soomro, G. H. (2006) Desertification: causes, consequences and remedies. *Pakistan Journal of Agriculture, Agricultural Engineering, Veterinary Sciences*. 22: 44-51.
- Shein, Y. V., Pachepskiy, Y. A., Guber, A. K., and Chekhova, T. I. (1996) Experimental determination of hydraulic and hydrochemical parameters in mathematical models for moisture and salt transfer in soils. *Eurasian Soil Science*. 28: 177-187.
- Shen, Y. K., Huang, Z. H., Li, D. Y., and Zhang, Y. (1992) Photophosphorylation in photosynthesis. Research in photosynthesis. Volume II. Proceedings of the IXth International Congress on Photosynthesis, Nagoya, Japan, Aug. 30-Sept. 4, 1992. 781-784.
- Shen, Y., Yu, S. L. (1997) Photosynthesis, respiration and transpiration of hydroponic Chinese cabbages under heat stress. *Chinese Journal of Agrometeorology*. 4: 81-86.

- Sheriff, D. W. (1979) Stomatal aperture and the sensing of the environment by guard cells. *Plant, Cell and Environment*. 2: 15-22.
- Shinde, B. N., Patil, V. K., and Kalalbandi, B. M. (2007) Studies on germination and polyembryony of different citrus rootstocks seedling at nursery stage. *Asian Journal of Horticulture*. 2: 180-183.
- Shinosaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 217-223.
- Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., and Waner, D. (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 627-658.
- Schurr, U., and Gollan, T. (1990) Composition of xylem sap of plants experiencing root water stress - a descriptive study. *Monograph - British Society for Plant Growth Regulation*. 21: 201-214.
- Shurr, U., Gollan, T., and Schulze, E. D. (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. *Plant Cell Environment*. 15: 561-567.
- Siefritz, F., Tyree, M. T., Lovisolo, C., Schubert, A., and Kaldenhoff, R. (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: From cellular effects to function in plants. *Plant Cell*. 14: 869-876.
- Silva, A. M., Rosa, R., and Candeias, M. (1988) Heat and water vapor transfer across the boundary layer of artificial leaves in a greenhouse. *Acta Horticulturae*. 229: 399-404.
- Silva-Robledo, H., Ortiz-Lizana, M., and Acevedo-Hinojosa, E. (2007) Hydric relationships and osmotic adjustment in wheat. *Agrociencia (Montecillo)*. 41: 23-34.
- Singh, J., Freeling, M., and Lisch, D. (2008) A position effect on the heritability of epigenetic silencing. *PLoS Genetics*. 4: 100-216.
- Siroky, J., Hodurkova, J., Negrutiu, I., and Vyskot, B. (1999) Functional and structural chromosome analyses in autotetraploid *Silene latifolia*. *Annals of Botany*. 84: 633-638.
- Sivakumar, M. V. K. (2007) Interactions between climate and desertification. *Agricultural and Forest Meteorology (Special Issue: The contribution of agriculture to the state of climate)*. 142: 143-155.
- Slotkin, R. K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdzic, M., Becker, J. D., Feijo, J. A., and Martienssen, R. A. (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell (Cambridge)*. 136: 461-472.
- Soliman, M. H., Omar, H. S., El-Awady, M. A., Al-Assal, S., and El-Din, A. A. Y. G. (2009) Transformation and expression of Na⁺/H⁺ antiporter vacuolar (*AtNHX1*) gene in tobacco plants under salt stress. *Arab Journal of Biotechnology*. 12: 99-108.

- Soltis, D. E., and Soltis, P. S. (1999) Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution*. 14: 348-352.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Schemske, D. W., Hancock, J. F., Thompson, J. N., Husband, B. C., and Judd, W. S. (2007) Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon*. 56: 13-30.
- Sperry, J. S., Stiller, V., and Hacke, U. G. (2003) Xylem hydraulics and the soil-plant-atmosphere continuum: opportunities and unresolved issues. *Agronomy Journal*. 95: 1362-1370.
- Spiegel-Roy, P., and Goldschmidt, E. E. (1996) *Biology of Citrus*. Biology of horticultural crops. Cambridge University Press, Cambridge, England. 230p.
- Srivastava, R., and Srivastava, G. K. (2002) Autopolyploids of *Helianthus annuus* L. var. *morden*. *Cytologia*. 67: 213-220.
- Stein, W. D. (1986) *Transport and diffusion across cell membranes*. Academic Press, Orlando, FL.
- Steudle, E., and Peterson, C. A. (1998) How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany*. 49: 775-788.
- Steudle, E. (2001) The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 847-875.
- Steudle, E. (2002) Transport of water in plants. *Environment Control in Biology*. 40: 29-37.
- Stiller, I., Dulai, S., Kondrak, M., Tarnai, R., Szabo, L., Toldi, O., and Banfalvi, Z. (2008) Effects of drought on water content and photosynthetic parameters in potato plants expressing the trehalose-6-phosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta*. 227: 299-308.
- Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., and Thomashow, M. F. (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat-DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *PNAS USA*. 94: 1035-1040.
- Strizh, I. G., and Neverov, K. V. (2007) Photoinhibition of photosystem II in vitro: spectral and kinetic analyses. *Russian Journal of Plant Physiology*. 54: 439-449.
- Stupar, R. M., Bhaskar, P. B., Yandell, B. S., Rensink, W. A., Hart, A. L., Ouyang, S., Veilleux, R. E., Busse, J. S., Erhardt, R. J., Buell, C. R., and Jiang, J. M. (2007) Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics*. 176: 2055-2067.
- Subramanyam, T. K., and Sinha, H. N. (1985) Characteristics of the salt affected soils of Tamluk West Bengal. *Recent Researches in Geology*. 11: 167-171.

- Swingle, W. T., and Reece, P. C. (1967) The Botany of Citrus and its Wild relatives. In *The Citrus Industry*, University of California, Reuther W., Webber H. J. and Bachelor L. D.: Riverside, California. 1: 190-430.
- Syvetsen, J. P., Lee, L. S., and Grosser, J. W. (2000) Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO₂. *Journal of American Society of Horticultural Science*. 125: 228-234.
- Szabolcs, I., and Molnar, E. (1980) Factors of soil formation and the soil forming processes on salt affected areas near Cegled. *Agrokemia es Talajtan*. 29: 7-34.
- Taiz, L., and Zeiger, E. (2006) *Plant Physiology* (4th Ed). Sinauer Associates, Sunderland, USA. 650p.
- Takahashi, S., and Murata, N. (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*. 13: 178-182.
- Takeda, S., and Paszkowski, J. (2006) DNA methylation and epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Chromosoma*. 115: 27-35.
- Tallman, G. (2004) Are diurnal patterns of stomatal movement the result of alternating metabolism of endogenous guard cell ABA and accumulation of ABA delivered to the apoplast around guard cells by transpiration? *Journal of Experimental Botany*. 55: 1963-1976.
- Tanaka, T. (1961) *Citrologia: Semi Centennial Commemoration Papers on Citrus Studies*. Citrologia supporting foundation. Osaka, Japan. 114p.
- Tang, S. Y., Chu, S. C., Shan, K. T., Shao, H. C., and Chang, L. C. (1978) Formation and evolution of salt-affected soils in the coastal area of Northern Kiangsu. *Acta Pedologica Sinica*. 15: 151-164.
- Therios, I. (2008) Stress-induced accumulation of proline and mannitol. (Crop Production Science in Horticulture Series, No.18). *Olives*. 2008. 18: 175-177.
- Thiyagarajah, M., Fry, S. C., and Yeo, A. R. (1996) *In vitro* salt tolerance of cell wall enzymes from halophytes and glycophytes. *Journal of Experimental Botany*. 47: 1717-1724.
- Thompson, A. J., Jackson, A. C., Parker, R. A., Morpeth, D. R., Burbidge, A., and Taylor, I. B. (2000) Absciscic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and absciscic acid. *Plant Molecular Biology*. 42: 833-845.
- Timperio, A. M., Egidi, M. G., and Zolla, L. (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*. 71: 391-411.
- Tjus, S. E., Moller, B. L., and Scheller, H. V. (1999) Photoinhibition of Photosystem I damages both reaction centre proteins PSI-A and PSI-B and acceptor-side located small Photosystem I polypeptides. *Photosynthesis Research*. 60: 75-86.

- Touraine-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D. T., Bligny, R. and Maurel, C. (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*. 425: 393-397.
- Triboulot, M. B., Fauveau, M. L., Breda, N., Label, P., and Dreyer, E. (1996) Stomatal conductance and xylem-sap abscisic acid (ABA) in adult oak trees during a gradually imposed drought. *Annales des Sciences Forestieres*. 53: 207-220.
- Tyermann, S. D., Bohnert, H. J., Maurel, C., Steudle, E., and Smith, J. A. C. (1999) Plant aquaporins: Their molecular biology, biophysics, and significance for plant-water relation. *Journal of Experimental Botany*. 50: 1055-1071.
- Tyermann, S. D., Niemietz, C. M., and Bramley, H. (2002) Plant aquaporins: Multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell and Environment*. 25: 173-194.
- Udall, J. A., Swanson, J. M., Nettleton, D., Percifield, R. J., and Wendel, J. F. (2006) A novel approach for characterizing expression levels of genes duplicated by polyploidy. *Genetics*. 173: 1823-1827.
- UNESCO. *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*. Disponible sur : <http://portal.unesco.org/>
- UNU. *United Nations University*. Disponible sur: <http://www.unu.edu/>
- Upadhyaya, S. K., Rand, R. H., and Cooke, J. R. (1988) Role of stomatal oscillations on transpiration, assimilation and water-use efficiency of plants. *Ecological Modelling*. 41: 27-40.
- Urayama, K., Sakata, Y., Sonoda, Y., Ebihara, K., Sago, Y., Yoshikoshi, H., Araki, T., Yasutake, D., Cho, H., Kobayashi, T., and Kitano, M. (2008) Preliminary column experiment on dynamics of water and ion transport in soil affected by root absorption. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*. 53: 543-547.
- US Census Bureau. *United State Census Bureau*. Disponible sur: <http://www.census.gov/>
- Vani, B., Saradhi, P. P., and Mohanty, P. (2001) Alteration in chloroplast structure and thylakoid membrane composition due to *in vivo* heat treatment of rice seedlings: correlation with the functional changes. *Journal of Plant Physiology*. 158: 583-592.
- Veste, M., Ben-Gal, A., and Shani, U. (2000) Impact of thermal stress and high VPD on gas exchange and chlorophyll fluorescence of *Citrus grandis* under desert conditions. *Acta Horticulturae*. 531: 143-149.
- Vollenweider, P., and Gunthardt-Goerg, M. S. (2006) Erratum to "Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage" [Environ. Pollut. 137 (2005) 455-465]. *Environmental Pollution*. 140: 562-571.

- Wang, H. B., Liu, D. C., Sun, J. Z., and Zhang, A. M. (2005) Asparagine synthetase gene *TaASN1* from wheat is up-regulated by salt stress, osmotic stress and ABA. *Journal of Plant Physiology*. 162: 81-89.
- Warner, D. A., and Edwards, G. E. (1993) Effects of polyploidy on photosynthesis. *Photosynthesis Research*. 35: 135-147.
- Webb, A. A. R. (2003) The physiology of circadian rhythms in plants. *New Phytologist*. 160: 281-303.
- Wei, C. F., Tyree, M. T., and Steudle, E. (1999) Direct measurement of xylem pressure in leaves of intact maize plants. A test of the cohesion-tension theory taking hydraulic architecture into consideration. *Plant Physiology*. 121: 1191-1205.
- Wei, L. L., Zhang, X. Q., Hou, Z. H., Xu, D. Y., and Yu, X. B. (2005) Effects of water stress on photosynthesis and carbon allocation in *Cunninghamia lanceolata* seedlings. *Acta Phytocologica Sinica*. 29: 394-402.
- Weig, A., Deswarte, C., and Chrispeels, M. J. (1997) The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiology*. 114: 1347-1357.
- Wendel, J. F. (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*. 42: 225-249.
- Wilkinson, S., and Davies, W. J. (1997) Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiology*. 113: 559-573.
- Wilkinson, S. (1999) pH as a stress signal. *Plant Growth Regulation*. 29: 87-99.
- Wilson, R. N., and Somerville, C. R. (1995) Phenotypic suppression of the gibberellin-insensitive mutant (*gai*) of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 108: 495-502.
- Woo, H. R., Dittmer, T. A., and Richards, E. J. (2008) Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*. 4: 100-156.
- Xia, X. L., Zhou, X. Y., and Yin, W. L. (1999) Ion compartmentation of leaf cells of *Ginkgo biloba* and *Ailanthus altissima* under salt stress. *Forestry Studies in China*. 1: 1-10.
- Xu, Y. H., Zhong, L., Wu, X. M., Fang, X. P., and Wang, J. B. (2009) Rapid alterations of gene expression and cytosine methylation in newly synthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Planta*. 229: 471-483.
- Yagmur, M., Kaydan, D., and Okut, N. (2006) Effects of potassium application on photosynthetic pigments, osmotic potential, K^+/Na^+ ratio and plant growth of barley under salinity. *Tarim Bilimleri Dergisi*. 12: 188-194.

- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994) A novel cis-acting element in Arabidopsis gene involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*. 6: 251-264.
- Yamane, K., Rahman, M. S., Kawasaki, M., Taniguchi, M., and Miyake, H. (2004) Pretreatment with antioxidants decreases the effects of salt stress on chloroplast ultrastructure in rice leaf segments (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science*. 7: 292-300.
- Yang, J. F., and Guo, Z. F. (2007) Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene (*SgNCED1*) from *Stylosanthes guianensis* and its expression in response to abiotic stresses. *Plant Cell Reports*. 26: 1383-1390.
- Yang, J. B., and Peng, Z. S. (2005) Epigenetic phenomena of plant polyploids. *Hereditas (Beijing)*. 27: 335-342.
- Yeo, E. T., Kwon, H. B., Han, S. E., Lee, J. T., Ryu, J. C., and Byun, M. O. (2000) Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (*TPS1*) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells*. 10: 263-268.
- Yephremov, and A. Schreiber, L. (2005) The dark side of the cell wall: molecular genetics of plant cuticle. *Plant Biosystems*. 139: 74-79.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K. (2006) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 5310-5318.
- Yu, H. Y., Li, T. X., and Zhou, J. M. (2007) Salt accumulation, translocation and ion composition in greenhouse soil profiles. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*. 13: 642-650.
- Zaharieva, I., Markova, Tz., and Velitchkova, M. (1998) Thylakoid membrane fluidity changes the response of isolated pea chloroplasts to high temperature. Photosynthesis: mechanisms and effects. Volume III. Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, Hungary, 17-22 Aug., 1998. 1823-1826.
- Zekri, M., and L. R., Parsons. (1992) Salinity tolerance of *citrus* rootstocks: Effect of salt on root and leaf mineral concentrations. *Plant Soil*. 147: 171-181.
- Zhan, Y. G., Chen, Q. S., Yuan, S. H., Liu, G. J., Liu, G. F., and Yang, C. P. (1999) K⁺ and Na⁺ content change in trees under salt stress and with tree salt tolerance. *Journal of Northeast Forestry University*. 27: 24-27.
- Zhang, C. L., and Fu, Z. S. (2005) Impact of water stress on the root and shoot growth of litchi seedlings. *Journal of Fruit Science*. 22: 339-342.
- Zhang, L. Y., Guo, Q. G., Li, X. L., Zeng, H., Tan, J. M., and Liang, G. L. (2005) Study on the relationship between the number of chloroplast in stomata guard cell and the ploidy of loguat cultivars. *Journal of Fruit Science*. 22: 229-233.

- Zhang, S. Z., Yang, B. P., Feng, C. L., and Tang, H. L. (2005) Genetic transformation of tobacco with the trehalose synthase gene from *Grifola frondosa* Fr. enhances the resistance to drought and salt in tobacco. *Journal of Integrative Plant Biology*. 47: 579-587.
- Zhang, F., Yang, Y. L., He, W. L., Zhao, X., and Zhang, L. X. (2004) Effects of salinity on growth and compatible solutes of callus induced from *Populus euphratica*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 40: 491-494.
- Zhanga, X. Y., Hub, C. G., and Yaoa, J. L. (2009) Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *Journal of Plant Physiology*. Submitted.
- Zhao, W. Z., Hu, G. L., Zhang, Z. H., and He, Z. B. (2008) Shielding effect of oasis-protection systems composed of various forms of wind break on sand fixation in an arid region: a case study in the Hexi Corridor, northwest China. *Ecological Engineering*. 33: 119-125.
- Zhao, G. Q., Mu, P., Wang, S. M., and Ren, J. Z. (2008) Salt tolerance of white clover transferred with vacuolar *AtNHX1* antiporter gene. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 16: 847-852.
- Zhong, W., Hartung, W., Komor, E., and Schobert, C. (1996) Phloem transport of abscisic acid in *Ricinus communis* L. seedlings. *Plant, Cell and Environment*. 19: 471-477.
- Zhou, X. Y., Zhao, N., and Zhang, H. (2000) Relation of stomatal movement and ion content change of guard cells in *Populus berolinensis* under water stress. *Forest Research, Beijing*. 13: 71-74.
- Zhu, J. K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 53: 247-273.
- Zusevics, J. A. (1980) Seasonal changes of permanent wilting coefficient in some selected tropical soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 11: 843-850.
- Zwieniecki, M. A., Melcher, P. J., and Holbrook, N. M. (2001) Hydraulic properties of individual xylem vessels of *Fraxinus americana*. *Journal of Experimental Botany*. 52: 257-264.

ANNEXES

Running title: Physiology and genomic expression of polyploids

Corresponding author:

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative. Avenue Agropolis - TA A-75 / 02, 34398 Montpellier cedex 5, France

Phone : (00 33) 4 67 61 71 54

Fax : (00 33) 4 67 61 56 66

E-mail: raphael.morillon@cirad.fr

Subject areas: polyploidy, environmental and stress response, regulation of gene expression

Number of tables: 4

Number of black and white figures: 3

Physiology and genomic expression of autotetraploids and allotetraploid intergeneric hybrid seedlings of *Citrus deliciosa* Ten. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. under salinity stress

Wafa Mouhaya^a, Thierry Allario^a, Dominique Dambier^a, Abdelaziz Hmyene^c, Bianca Elena Maserti^d, Yann Froelicher^a, François Luro^b, Patrick Ollitrault^a and Raphaël Morillon^a

^aCentre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative. Avenue Agropolis - TA A-75 / 02, 34398 Montpellier cedex 5, France

mouhayawafa@hotmail.com, allario@cirad.fr, dambier@cirad.fr, froelicher@corse.inra.fr,
ollitrault@cirad.fr, morillon@cirad.fr

^bUnité GEQA, Station INRA de San Giuliano, 20230 San Giuliano, France.

luro@corse.inra.fr,

^cFaculté des Sciences et Technique, Université Hassan II - FSTM BP 146, Mohammedia, Morocco.

hmyeneaziz2002@yahoo.fr

^dCNR - IBF, Istituto di BioFisica , Area della Ricerca, Via Moruzzi 1- I-56125 Pisa. Italy.

bianca.elena.maserti@pi.ibf.cnr.it

ABSTRACT

Polyploidy affects plant physiology and may be the cause of a better adaptation to environmental constraints. We investigated the physiological responses to salt stress of an allotetraploid intergeneric hybrid (FLHORAG1) compared to its diploid parents, Willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) and their spontaneous autotetraploids. The allotetraploid status of FLHORAG1 was confirmed and the parental origin of its mitochondria and chloroplasts was verified. When subjected to salt stress, autotetraploid trifoliate orange, diploid and autotetraploid Willow leaf mandarin and FLHORAG1 were more tolerant to salt stress than the chlorotic diploid trifoliate orange. Trifoliate orange genotypes and FLHORAG1 had much higher leaf chloride concentrations than Willow leaf mandarin genotypes. Using cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism methodology, differences of gene expression patterns between diploid and autotetraploid genotypes were very limited while the allotetraploid presented non additive expression with a marked mandarin dominance. Analysis of the sequences of isolated transcripts expressed under control and salt stress conditions revealed genes that may be involved in the phenotypical differentiation of tetraploids and their better tolerance to salt stress.

Keywords:

Citrus, polyploidy, salt stress

1. Introduction

Drought, calcareous soil, iron deficiency and salinity are the main abiotic constraints that citrus trees encounter. In the Mediterranean basin, providing new rootstocks that are more tolerant to salt stress is a goal for a sustainable citrus industry. Citrus scion varieties are grown on rootstocks to overcome those environmental problems [1].

Due to partial apomixis, citrus rootstocks are propagated by polyembryonic seeds. Spontaneous autotetraploid plants arise in seedlings with a frequency varying from 1 to 7%. These autotetraploids arise from chromosome stock doubling of nucellar cells (maternal tissue) [2].

Based on seedling growth and accumulation of chloride in leaves under salinity stress in a growth chamber, autotetraploid plants of trifoliate orange, Carrizo citrange and Cleopatra mandarin were shown to be more tolerant to salt stress than their respective diploid parents [3].

As well, we found that Cleopatra mandarin autotetraploid plants presented a greater growth rate than diploid when subjected to salt stress suggesting that those autotetraploid genotypes experience a better adaptation to stress. Polyploid leaves have larger stomata and a decreased stomata density [4]. Leaves of autotetraploid citrus are thicker and have larger mesophyll cell volume [5]. Autotetraploid citrus seedlings were shown to have lower growth rates than their respective diploid parents, associated with lower rates of whole plant transpiration [6].

Allopolyploidization is often accompanied by epigenetic processes such as modification in DNA cytosine methylation and activation of transferable elements [7]. Genetic remodeling caused by DNA rearrangements, gene activation, gene silencing, loss of genes were also reported. If the increase in the number of copies of alleles and epigenetic processes in allotetraploids are factors leading to improved plasticity [7], we may expect that citrus allotetraploids may have better tolerance to salt stress than their diploid parents.

Even if the number of studies aimed to identify changes in the genome expression pattern of autotetraploids is less numerous [8, 9], it has been proposed that an alteration of the expression of any allele in autotetraploid may result in phenotype changes since no potential for homologous complementation or advantageous subfunctionalization would occur. Stupar *et al.*

[9] investigated the transcriptome expression between diploid, and autotetraploid clones of potato and observed that gene expression changes were very limited even though large phenotypical differentiation was observed between both genotypes. For those authors, since all the alleles of autopolyploids derive from a single species, we should expect a fewer gene expression changes compared to an allotetraploid genotype. Then, gene expression changes observed in between diploid and autotetraploid genotypes may be attributed to nuclear dosage and ploidy-driven cellular modifications that may affect cell size, division rates, or organellar composition [9].

The tolerance of citrus rootstocks to salt stress has been widely investigated [1]. Unlike most plant species that are affected by salt stress by the accumulation of sodium, in citrus trees, salinity sensitivity is usually associated with the accumulation of chloride [10]. One way to improve tolerance to salt stress is to limit the accumulation of chloride in the leaf by limiting its absorption at root level [11]. Indeed, the salt tolerant rootstocks Cleopatra mandarin and Rangpur lime are chloride excluders [12] whereas trifoliate orange and its hybrids, which are much more sensitive to salt stress, appear to be sodium excluders and chloride accumulators [12]. Mechanisms involved in chloride exclusion are poorly understood, therefore identification of genes coding for chloride transporters is an important goal. cDNA-AFLP methodology [13] has been widely used to investigate genome expression of polyploids in non-stress conditions [14]. However, studies of genome expression in polyploids in stress conditions are just beginning [15]. According to these authors, genes duplicated by polyploidy in ancestral polyploids are preserved in their genomes because their expression has been partitioned in response to environmental stress.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Seeds of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf., cv Pomeroy, SRA 1074) and Willow-leaf mandarin (*Citrus deliciosa*, Ten., SRA133) were provided by the citrus germplasm of the INRA and CIRAD Research Station of San Giuliano in Corsica, France. The somatic hybrid, FLHORAG1 [16], which was obtained by electrofusion between diploid Willow-leaf mandarin and trifoliate orange was also investigated. Seeds were put to germinate in a mixture of sand, soil and peat (1:1:1) in a greenhouse.

2.2. Plant conformity: ploidy analysis.

Autotetraploid plants were identified by flow cytometry according to Saleh *et al.* [3]. FLHORAG1 seedlings were obtained from seeds obtained from a tetraploid mother tree and all the seedlings were found to be tetraploid. Chromosome squash of FLHORAG1 was performed as described [17].

2.3. Plant conformity: nucellar/zygotic plant status and cytoplasmic DNA origin in FLHORAG1.

The genetic constitution of the diploid and tetraploid seedlings was analyzed using 5 SSR markers: mCrCIR01F04a, CrCIR07E05, mCrCIRCI02D03, mCrCIR05A05 and mCrCIR02G12 (Table 1). Eighteen previously reported SSR markers [18, 19, 20] as well as fourteen new polymorphic SSR markers between trifoliate orange and mandarin parents that were developed using the protocol as described [19], (Table 1), were selected to check the nuclear origin of FLHORAG1. The origin of chloroplastic and mitochondrial genomes in FLHORAG1 was investigated using ccmp3, ccmp4 [21] and NTCP9 [22] chloroplastic SSR markers, and using nad7/1-2 and nad5/2-1 mitochondrial PCR markers.

2.4. Tetraploid leaf morphology, plant growth rate

A total of 20 uniform diploid and tetraploid seedlings of each genotype and aged four months were selected and transplanted in the same substrate in 3 L pots. Plants were grown in a greenhouse at a day/night temperature of 20-29 °C/16-18 °C respectively. Fluorescent tubes

(Osram G130 and Fluora 77) were used to produce 300 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}^{-1}$ as a photosynthetic active radiation. The photoperiod was 16/8 h (light/dark). Plants were watered with half diluted nutrient solution (fertilizer 28-14-14, ref 205, Fertil, France).

Once plants were six months old, the increase in stem length of diploids and tetraploids was monitored during one month in the greenhouse using a ruler. Total leaf greenness was measured using a SPAD meter (Minolta, SPAD-502, Japan). Surface area and thickness of 10 leaves of each genotype were measured respectively by scanning the leaves and using a micrometer (Mitutoyo, IP65, Japan). The slides for analysis of stomatal size and density (50 to 60 stomata were measured) were prepared as described [23].

2.5. Salt stress experiment

At one year, plants had already branches. 12 uniformly sized seedlings of each of the five genotypes were transferred and assigned at the random in 2 blocks in a growth chamber. Six were assigned to control treatment and the six others to salinity treatment. After one month of acclimation, plants were watered by soaking pots for one hour twice a week either in water supplemented with half-diluted nutrient solution, or in 50 mM NaCl solution supplemented with half-diluted nutrient solution. Plants were not watered between soakings. Experiments were conducted for 56 days. Temperatures ranged from 16-18 °C at night and from 28 to 30 °C during the day, the relative humidity was maintained between 60 and 70 % and the light/dark period was 16/8 h.

2.6. Leaf mineral analysis: sodium and chloride contents

To avoid removing too many leaves for sodium and chloride assays, two leaves from three different seedlings of each genotype and control/stress conditions were harvested periodically throughout the salinity treatments. Sodium and chloride contents were measured as described [3].

2.7. Gene expression analysis: cDNA-AFLP methodology

Leaf samples were harvested regularly (Day0 (D0), D15, D35, D56) in liquid nitrogen and were stored at minus 80 °C.

Total RNA was extracted from leaves collected during the sixth week (D42) of the salt treatment. cDNA synthesis. Poly(A) RNA were isolated from 200 ng of total RNA using a biotinylated oligo(dT) probe (PolyATtract mRNA Isolation System III and IV, Promega) according to the manufacturer's instructions. Synthesis of the first strand of cDNA was driven by reverse transcription on 2 µg of poly(A) RNA, of which the second strand was synthesized using RNase H and DNA Polymerase I (Universal Riboclone cDNA Synthesis System, Promega).

cDNA-AFLP. AFLP reactions were performed as described [13]. Amplified cDNA fragments were separated by electrophoresis in denaturing polyacrylamid gel and revealed by silver nitrate staining.

2.8. Data analysis of Transcript Derived Fragments (TDFs)

The data matrix was composed of 35 TDFs (amplified fragments that showed qualitative alterations in gene expression, appearance or disappearance, depending on the conditions (control or salt stress) and genotypes as variables and 10 combinations of genotypes × treatments (5 genotypes × 2 treatments) as individuals. The data were scored 1 for presence or 0 for absence.

In order to analyze the structuration of the expression pattern variability among the 10 genotypes × conditions, we ran a Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on Dice dissimilarity from the TDFs matrix using @DARwin 4.0 software (CIRAD Montpellier, France).

2.9. Isolation and sequencing of TDFs.

Ploidy and/or salt stress-regulated TDFs were excised from the cDNA-AFLP polyacrylamid gels, hydrated and then recovered by PCR under the same conditions used for pre-amplification as described by [13] Vos et al. (1995). Purified PCR products were ligated to the pUCm-T vector (Bio Basic Inc. DNA cloning vector kit). Plasmids were then sent to MWG-Biotech (Germany) for sequencing.

2.10. Gene function analysis.

Database searches were performed using the BLAST Network Service (NCBI, National Center

for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Each TDF was searched among all sequences in the non-redundant databases using the BLASTN and TBLASTX algorithms and in the citrus EST database (CFGF database, Citrus Functional Genomic project, <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/bioinfo.ibmcp.upv.es>).

2.11. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SIGMASTAT from SPSS (Chicago; www.spss.com_software_science) to analyze the data. The t and ANOVA tests were used to detect differences at the usual probability level of $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Tetraploid obtaining and genetic constitution analysis

The percentages of autotetraploid trifoliate orange and Willow leaf mandarin were respectively 5.1 and 4%. Two trifoliate orange out of 40 and one Willow leaf mandarin out of 37 were found zygotic. Only nucellar plants were kept for further investigations. Chromosome squash and microscopic observations showed that FLHORAG1 presented 36 chromosomes (Fig. 1). Molecular analysis using 32 SSR markers showed that FLHORAG1 presented specific alleles of both parents (Table 1). Chloroplastic and mitochondrial markers clearly revealed that FLHORAG1 inherited respectively chloroplasts from its trifoliate orange parent and mitochondria from its Willow leaf mandarin parent (Table 2).

3.2. Tetraploid plant growth rate and leaf morphology

In greenhouse growth conditions, autotetraploid plants were significantly smaller than their respective diploids (Table 3) as already observed by Saleh et al. [3]. FLHORAG1 presented an intermediate vigor between its diploid parents and a greater vigor than both autotetraploid parental genotypes (Table 3). FLHORAG1 inherited trifoliate leaves from its trifoliate orange parent. Tetraploid presented greenness values that were at least 20 % higher than those of diploids (Table 3). The leaf thickness of the tetraploids was greater than that of the diploids, whereas there was no significant difference in leaf area between them (Table 3). Investigation of stomatal cell size revealed that tetraploids had much bigger stomata with a lower stomata density compared to diploids (Table 3).

3.3. Salt stress and ion content.

Plants were subjected to 8 weeks of salt treatment. At the end of the salt stress, diploid trifoliate orange was the only genotype that was chlorotic and dropped leaves. Autotetraploid trifoliate orange, Willow leaf mandarin and FLHORAG1 did not show any visible symptoms.

Leaf sodium accumulation was very low in diploid trifoliate orange and autotetraploid genotypes and in FLHORAG1 (Fig. 2A & C). However, Willow leaf mandarin genotypes accumulated

sodium, a greater content being observed in autotetraploids than in diploids (Fig. 2B). Trifoliate orange and FLHORAG1 accumulated similarly high levels of chloride (Fig. 2D & F). Chloride accumulation was relatively low in Willow leaf mandarin genotypes, and was similar in diploid and tetraploid seedlings.

3.4. Gene expression - cDNA-AFLP analysis

After 35 days of stress, a significant increase in chloride leaf content was observed in FLHORAG1 stressed plants compared to controls. In addition, a significant increase in leaf sodium content was observed in Willow leaf mandarin genotypes. However, after 35 days of stress, no symptoms of chlorosis were observed in diploid trifoliate orange. We choose this date for gene expression analysis because we assumed that mechanisms for salt stress tolerance would be triggered by this time. On the different polyacrylamid gels we analyzed, we detected 35 TDFs that presented contrasted expression depending on the genotype, ploidy level, and growth conditions: 21 TDFs presented polymorphism in control conditions, whereas 29 TDFs presented polymorphism in stress conditions. FLHORAG1 presented additive profiles for 19 TDFs compared with its diploid parents. Moreover, one TDF expressed in diploids and autotetraploids in both stress and control conditions appeared to be repressed in FLHORAG1. Five TDFs were specific to autotetraploid Willow leaf mandarin (five expressed in stress conditions), two being specific to autotetraploid trifoliate orange (one expressed in control conditions), one being specific to tetraploids (control and stress conditions).

All the TDFs observed were used to compare gene expression between parents, their respective autotetraploids and the allotetraploid FLHORAG1. A factorial correspondence analysis (PCoA) was performed in order to analyse the structuration of the expression pattern variability. Interestingly, the 3 first axes are strongly associated with the three factors of variability in our trial: genotype (allelic constitution), salt treatments and ploidy (autotetraploid versus diploid) with respectively 67%, 13% and 6% of total variability (Fig. 3). Altogether, the 3 first axes explain 86% of the total variability of the observed expression patterns. On figure 3A are

represented the two first axes, X and Y. X axis distinguished mainly between the different allelic constitution of the genotypes with strong opposition of trifoliate orange and Willow leaf mandarin whatever their ploidy level and growing conditions. Y axis opposed plants of a same genotype growing in control and stress conditions. On figure 3B are represented the second and third axes, Y and Z. Z axis distinguished between diploid and autotetraploid genotypes. The position of FLHORAG1 in axis X (figure 3A) indicates a non additive gene expression with a Willow leaf mandarin dominance; indeed FLHORAG1 was showed to be much closer to Willow-leaf mandarin than trifoliate orange. FLHORAG1 had more genes expressed in common with Willow leaf mandarin than with diploid trifoliate orange (respectively 11 versus 5 in control conditions and 13 versus 6 in stress).

All TDFs used for genetic analysis were excised, amplified and sent for sequencing. Out of the 35 obtained sequences, 22 did not match with any known genes and 13 presented similarity E value $< 1.e^{-5}$ with EST citrus sequences in the database. Those 13 genes were identified to be up- or down-regulated depending on the genotype, the ploidy level, and the plant growth conditions (Table 4). Three genes encoding respectively for an arginine N-methyltransferase protein, a Serine / threonine kinase and an amino acid permease 1 (TDF n°1, 5, 7) were expressed only in stressed autotetraploid Willow leaf. A choline monooxygenase cDNA (TDF n°2) was shown to be specific to tetraploids. One cDNA encoding for a group 5 late embryogenesis abundant protein (TDF n°3) was expressed only in the diploid parents and in the respective autotetraploids but not in FLHORAG1. Two TDFs were only expressed in tetraploid trifoliate orange (TDFs n° 4, 6). Other TDFs identified were expressed in FLHORAG1 and in one of its two genitors (TDFs n° 8 to 13).

4. Discussion

Our search for tetraploid and zygotic plants showed that most of the seedlings from a diploid mother tree were nucellar. Chromosome squash of FLHORAG1 and use of SSR markers enabled us to determine that this allotetraploid arose from the addition of the whole nuclear genome of its both parents with probably no deletion event. We can thus assume that transcriptome skew in FLHORAG1 regarding additive gene expression hypothesis is due to changes in its genome regulation. In addition, we showed that FLHORAG1 inherited chloroplasts from trifoliate orange and mitochondria from Willow leaf mandarin.

The allotetraploid FLHORAG1 inherited morphology similar to its trifoliate orange parent. In greenhouse conditions without any stress, diploid plants grew faster than their respective autotetraploids (Table 3). The allotetraploid FLHORAG1 presented an intermediate growth rate between Willow leaf mandarin and trifoliate orange diploids but a greater growth rate than autotetraploid genotypes, suggesting that heterosis favored its growth (Table 3). In the halophytic salt-marsh species *Spartina anglica*, allopolyploids were characterized by rapid expansion associated with rapid genetic and epigenetic changes that facilitate plant adaptation to salinity [24].

Investigations of leaf greenness, leaf thickness, leaf area and stomata size showed that FLHORAG1 was very similar to the autotetraploid trifoliate orange genotype (Table 3). Leaves of tetraploids were greener and thicker than those of diploids. This result is not surprising since it has been shown that tetraploids have more chloroplasts than diploids and there is consequently an increase in their chlorophyll content [25, 26]. Leaf areas of autotetraploids did not differ significantly from those of their respective diploids. Romero-Aranda et al. [5] observed no difference in leaf area between diploid and tetraploid citrus genotypes when grown under high irradiance. In autotetraploid trifoliate orange and Willow leaf mandarin and allotetraploid FLHORAG1, the stomata were clearly bigger and their density was much lower than in diploids (Table 3). So, the differences in stomatal size and density, of leaf thickness between diploids and

tetraploids as well as differential environmental growth conditions such as light, temperature and humidity, made it difficult to determine the most important factor responsible for the differences in growth rate observed between diploid and autotetraploid and allotetraploid seedlings.

In salt stress conditions, diploid trifoliate orange was the only genotype that displayed visible symptoms of salt damage and leaf drop as already reported by Saleh et al. [3]. Ion contents clearly supported the hypothesis that trifoliate orange genotypes were sodium excluders [12], whereas Willow leaf mandarin genotypes accumulated sodium (respectively Fig. 2A & B). Interestingly, Willow leaf mandarin tetraploids accumulated more sodium than their respective diploids. So it is possible that the greater leaf thickness associated with larger cell size in tetraploids may lead to increased sodium accumulation.

FLHORAG1 apparently inherited the capacity to exclude sodium from its trifoliate orange parent (Fig. 2C). Since the sensitivity of citrus to salt stress is due to chloride [27], trifoliate orange genotypes that presented high chloride contents (Fig. 2D) should have both displayed leaf chlorosis. However, even if the chloride contents of diploid and autotetraploid trifoliate orange genotypes were similar, no leaf fall and no symptom of chlorosis were observed in autotetraploids. In our conditions, it is not surprising that Willow leaf mandarin genotypes did not accumulate much chloride since Willow leaf is close related to the Cleopatra mandarin genotype, which is one of the most salt tolerant rootstocks known to be a chloride excluder [12]. In FLHORAG1, which did not display any salt stress symptoms, chloride accumulation did not significantly differ from that in diploid and autotetraploid trifoliate orange leaves. It may be possible that autotetraploid genotypes and FLHORAG1 presented a greater tolerance because they have a stronger antioxidant defense system that protect them better when toxic ions accumulation may occur.

After 35 days of stress, changes in leaf chloride and sodium contents were observed in Willow leaf mandarins and FLHORAG1 genotypes, although no symptoms of stress were observed. At this date, changes in gene expression profiles were observed on cDNA-AFLP electrophoresis

gels depending on the genotype, the ploidy status and on growth conditions. The PCoA performed from the TDFs matrix clearly demonstrated the predominance of the genotype (allelic constitution component) on the expression variability since it represents 67% of the total variability. Plant treatments (control or stress condition) were associated to 13% of total variability and ploidy status (diploid versus autotetraploid) represented only 6% of the total expression variability (Fig. 3A & B). FLHORAG1 presented a non additive expression pattern compared to its two diploid parents due to mandarin dominance with 24 common expression profiles compared to the 11 common expression profiles observed with trifoliate orange, but also the presence of specific TDFs. In a single addition of genome producing the allotetraploid hybrid, without loss of parental portion of the genome, the dominance of the mandarin transcriptome can be associated with neo-regulation of gene expression with preferential silencing of trifoliate orange genes.

In control conditions, the limited expression variation between diploid and autotetraploid and the non additive expression in allotetraploid we observed are in agreement with previous results obtained in *Arabidopsis* in non-stress condition. Indeed, Wang et al. [28] have shown that changes in gene regulation occurred mostly in allotetraploid genotypes, while very limited changes were observed in autotetraploid genotypes of *Arabidopsis*. In allotetraploid cotton plants, it has been shown that out of 40 gene pairs, 27 homeolog pairs contributed equally to the transcriptome and 13 exhibited biased expression or silencing [29].

All the TDF fragments we analyzed were excised, newly amplified and sequenced. We identified several genes known to be expressed when salt stress occurs (Table 4). A gene coding for zinc finger protein [30] which is known to be part of stress signal transduction, was expressed in Willow leaf and FLHORAG1 genotypes. Other genes coding of Inorganic pyrophosphorylase 1, 5'-AMP-activated protein kinase beta-1 subunit-related or 23kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II were shown to be expressed in FLHORAG1 and trifoliate orange or Willow leaf genotypes and clearly participated to the stucturation of the axe 1

presented in figure 3A. A gene coding for protein arginine N-Methyltransferase was shown to be expressed only in autotetraploid Willow leaf stressed genotype. Interestingly, in *A. thaliana*, a protein arginine N-Methyltransferase 5 (AtPRMT5), was recently shown to symmetrically dimethylate histone H4R3. The mutations in *AtPRMT5* resulted in several developmental defects such as growth retardation, dark green leaves, and late flowering [31]. A linkage between DNA methylation and histone arginine methylation in gene silencing has been reported [32] suggesting *PMRT* genes are involved in regulation of the expression of polyploid genomes. In addition, genes encoding for group 5 late embryogenesis abundant protein was expressed in all the genotypes except FLHORAG1 (Table 4). In citrus, a 5 late embryogenesis abundant protein, which is known to be a chaperon protein, was shown to be induced in salt stress condition [33]. As well, a gene coding a choline monooxygenase, a key enzyme involved in glycine betaine biosynthesis pathway was expressed only in tetraploid genotypes and may then participate to the differentiation between diploids and tetraploids. Glycine betaine is an osmoregulant that favors water availability for cells [34] and protects enzymes involved in growth and photosynthesis [35]. Since this gene was only expressed in tetraploids we may suppose that this osmoticum may be synthesized in greater amount in polyploids and may facilitate their adaptation to abiotic stress [36].

Our study is the result of the analysis of a limited number of TDFs presenting different profiles for different genotypes, among hundreds that did not change. In order to confirm our results, it would be required to study a larger number of TDFs. Interestingly, our results are in agreement with a proteomic study in allotetraploids citrus [37] that showed predominant protein expression of diploid Willow leaf mandarin compared to the other parents, lime and kumquat. In stress conditions, changes in genes expression occurred in all the tetraploid versus the diploid genotypes.

To conclude, the physiological results we obtained confirmed the potential interest to investigate citrus autotetraploid and allotetraploid genotypes as a new source of rootstocks since tetraploids

seedlings were shown to be more tolerant to salt stress than diploids. Also, in order to confirm the involvement of the genes potentially involved in tetraploid salt stress tolerance we isolated, it would be necessary to quantitatively characterize the expression of those genes.

Acknowledgements

Funding for this work was provided by “Comité Mixte Inter Universitaire Franco-Marocain” [Programme Volubils, MA/05/137] to W M. This work was supported by Interreg IIIA program and European “INCO” project [FP6 – 2003 - INCO – DEV – 2 n° 015453].

We thank C. Jacquemond, F. Curk (Unité GEQA, INRA, San Giuliano, France) for providing diploid seedlings and technical assistance. Francois Santoni from Office de l’Equipement Hydraulique de la Corse (OEHC) is also thanked for ICP assays.

References

- [1] Y. Levy, J.P. Syvertsen, Irrigation water quality and salinity effects in citrus trees, In: Janick J, editor. Hort. Reviews 30 (2004) 37–82.
- [2] J.W. Cameron, R.K. Soost, Characters of new populations of Citrus polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny, in: H.D. Chapman (Eds.), Proc. Int. Citric. Symp., University of California at Riverside 1 (1969) 199–205.
- [3] B. Saleh, T. Allario, D. Dambier, P. Ollitrault, R. Morillon, Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid, C. R. Biol. 331 (2008) 703–710.
- [4] ZJ Chen., Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids, Ann. Rev. Plant Biol. 58 (2007) 377–406.
- [5] R. Romero-Aranda, R. Bondada, J.P. Syvertsen, J.W. Grosser, Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autotetraploid citrus, Ann. Bot. 79 (1997) 153–160.
- [6] J.P. Syvertsen, L.S. Lee, J.W. Grosser, Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO₂, J. Am. Soc. Hort. Sci. 125 (2000) 228–234.
- [7] T.C. Osborn, J.C. Pires, J.A. Birchler, D.L. Auger, Z.J. Chen, H.S. Lee, L. Comai, A. Madlung, R.W. Doerge, V. Colot, R.A. Martienssen, Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids, Trends Genet. 19 (2003) 141–147.
- [8] M. Guo, D. Davis, J.A. Birchler, Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series, Genetics 142 (1996) 1349–1355.

- [9] R.M. Stupar, P.B. Bhaskar, B.S. Yandell, W.A. Rensink, A.L. Hart, S. Ouyang, R.E. Veilleux, J.S. Busse, R.J. Erhardt, C.R. Buell, J. Jiang, Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization, *Genetics* 176 (2007) 2055–67.
- [10] J.L. Moya, A. Gomez-Cadenas, E. Primo-Millo, M. Talon, Chloride tolerance in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water usage, *J. Exp. Bot.* 383 (2003) 825–833.
- [11] J. Bañuls, E. Primo-Millo, Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of Citrus plants, *Phys. Plant.* 86 (1992) 115–123.
- [12] M. Zekri, L.R. Parsons, Salinity tolerance of citrus rootstocks: Effect of salt on root and leaf mineral concentrations, *Plant Soil* 147 (1992) 171–181.
- [13] P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper M. Zabeau, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nuc. Acids Res.* 23 (1995) 4407–4414.
- [14] L. Comai, A.P. Tyagi, K. Winter, R. Holmes-Davis, S.H. Reynolds, Y. Stevens, B. Byers, Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed arabidopsis allotetraploids, *Plant Cell* 12 (2000) 1551–68.
- [15] Z.L. Liu, K.L. Adams, Expression partitioning between genes duplicated by polyploidy under abiotic stress and during organ development. *Current Biology* 17 (2007) 1669–1674.
- [16] P. Ollitrault, D. Dambier, M. Seker, Y. Froelicher, Rootstock breeding by somatic hybridization for the Mediterranean citrus industry, *Acta Hort.* 535 (2000) 157–162.
- [17] A. D’Hont, L. Grivet, P. Feldmann, P. Rao, N. Berding, J.C. Glaszmann, Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics, *Mol. Gen. Genet.* 250 (1996) 405–413.
- [18] Y.Froelicher, J.B. Bassene, E. Jedidi-Neji, D. Dambier, R. Morillon, G. Bernardini,

- Costantino G., P. Ollitrault, Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets, *Plant Cell Rep.* 26 (2007) 937–944.
- [19] Y. Froelicher, D. Dambier, J.B. Bassene, G. Costantino, S. Lotfy, C. Didout, V. Beaumont, P. Brottier, A-M. Risterucci, F. Luro, P. Ollitrault, Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco), *Mol. Ecol. Res.* 8 (2008) 19–122.
- [20] F. Luro, G. Costantino, J. Terol, X. Argout, T. Allario, P. Wincker, M. Talon, P. Ollitrault, R. Morillon, Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping, *BMC Genomics* 9 (2008) 287.
- [21] K. Weising, R.C. Gardner, A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms, *Genome* 42 (1999) 9–19.
- [22] G.J. Bryan, J. McNicoll, G. Ramsay, R.C. Meyer, W.S.D. Jong, Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theor. Appl. Genet.* 99 (1999) 859–867.
- [23] R. Morillon, M.J. Chrispeels, The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 14138–14143.
- [24] A. Salmon, M. Ainouche, J. Wendel, Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (*Poaceae*), *Mol. Ecol.* 14 (2005) 1163–1175.
- [25] A.J. Jellings, R.M. Leech, Anatomical variation in first leaves on nine *Triticum* genotypes and its relationship to photosynthetic capacity, *New Phytol.* 96 (1984) 371–382.
- [26] D.A. Warner, M.S.B. Ku, G.E. Edwards, Photosynthesis, leaf anatomy, and cellular constituents in polyploidy C4 grass *Panicum virgatum*, *Plant Physiol.* 84 (1987) 461–466.

- [27] R. Romero-Aranda, J.L. Moya, F.R. Tadeo, F. Legaz, E. Primo-Millo, M. Talon, Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations, *Plant, Cell and Env.* 21 (1998) 1243–1253.
- [28] J. Wang, L. Tian, H-S. Lee, N. Wei, H. Jiang, B. Watson, A. Madlung, T. Osborn, R.D. Doerge, L. Comai, Z.J. Chen, Genome-wide Non-additive Gene Regulation in Arabidopsis Allotetraploids, *Genetics* 172 (2006) 507–517.
- [29] K.L. Adams, R. Percifield, J.F. Wendel, Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid, *Genetics* 168 (2004) 2217–2226.
- [30] H. Sakamoto, K. Maruyama, Y. Sakuma, T. Meshi, M. Iwabuchi, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions, *Plant Physiol.* 136 (2004) 2734–2746.
- [31] Y. Pei, L. Niu, F. Lu, C. Liu, J. Zhai, X. Kong, X. Cao, Mutations in the type II protein arginine methyltransferase AtPRMT5 result in pleiotropic developmental defects in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1913–1923.
- [32] X. Le Guezennec, M. Vermeulen, A.B. Brinkman, W.A. Hoeijmakers, A. Cohen, E. Lasonder, H.G. Stunnenberg, MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties, *Mol. Cell Biol.* 26 (2006) 843–851.
- [33] A. Moons, G. Bauw, E. Prinsen, M. Van Montagu, D.V.D. Straeten, Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties, *Plant Physiol.* 107 (1995) 177–186.
- [34] R. Gabbay-Azaria, E. Tel-Or, M. Schönfeld, Glycine betaine as an osmoregulant and compatible solute in the marine cyanobacterium *Spirulina subsalsa*, *Arch. Biochem. Biophysics.* 264 (1988) 333–339.

- [35] A. Sakamoto, N. Murata, The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants, *Plant Cell and Env.* 25 (2002) 163–171.
- [36] H. Hayashi, A. Sakamoto, H. Nonaka, T.H.H. Chen, N. Murata, Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic *Arabidopsis* with a bacterial gene (*codA*) for choline oxidase, *J. Plant Res.* 111 (1998) 357–362.
- [37] A-L. Gancel, J. Grimplet, F.X. Sauvage, P. Ollitrault, J.M. Brillouet, Predominant expression of diploid mandarin leaf proteome in two citrus mandarin-derived somatic allotetraploid hybrids, *J. Agr. Food. Chem.* 54 (2006) 6212–6218.

Tables

Table 1. Nuclear SSR markers used for the characterization of allotetraploid FLHORAG1. Numbers in the table correspond to the band size obtained for each genotype. *SSR markers defined in this paper. ^bSSR markers used for analyzing the genetic conformity of the seedling.

SSR markers		Genotypes			
Primer name	Primer sequence (5' -> 3')	Ta (°C)	Trifoliolate orange	Willow leaf mandarin	FLHORAG1
Ci01C07	[19]	55	272	258/260	258/260/272
Ci02A04	[19]	55	180	184	180/184
Ci02B07	[19]	50	184	178/186	178/186/184
Ci02C09	[19]	50	253	269	253/269
Ci02F03	[19]	55	174	186	174/186
Ci07C07	[19]	50	225	243/255	225/243/255
Ci07D06	[18]	55	161	179/187	161/179/187
Ci07E06	[19]	55	256	244	244/256
mCrCIR01D06a	[19]	50	244	248/250	244/248/250
mCrCIR01F04a ^b	[19]	55	200/206	214/218	200/206/214/218
mCrCIR01F08a	[19]	50	32	136	132/136
mCrCIR02A01*	F : TAAATGGTGACTGGTGAG R : GCTTATGGATTGCGTT	55	312	304	312/304
mCrCIR02B11*	F : GTATTTGGCGTGATGAA R : CAAAGTAAATAGGGTGTGAG	55	247	256/264	247/256/264
mCrCIR02D03* ^b	F : CAGACAACAGAAAACCAA R : GACCATTTCCTCACTCAA	55	292/312	296/312	292/296/312
mCrCIR02D04b*	F : CTCTCTTTCCCCATTAGA R : AGCAAACCCACACAAC	50	211/213	215/244	211/213/215/244
mCrCIR02D11*	F : GAGTTGACCGAGAAGATT R : TGAGTTTCAGTAAGTGATGAG	55	192	218/220	192/218/220
mCrCIR02E02a*	F : AGTGAGAAAGACTGGTGTG R : ACTTTCCCCATTTTGAT	50	220/222	210/220	210/220/222
mCrCIR02E08*	F : GGTTTGTGGGAGGTG R : TGATTAGCATGTTGCG	50	316	276/284	276/284/316
mCrCIR02G02*	F : CAATAAGAAAACGCAGG R : RTGGTAGAGAAACAGAGGTG	55	130/134	136/140	130/134/136/140
mCrCIR02G08*	F : CATGCAATGTTCCACTT R : AGGCAGTTGTTAGACCC	50	250	260	250/260
mCrCIR02G12* ^b	F : AAACCGAAATACAAGAGTG R : TCCACAAACAATACAACG	55	278	266	266/278
mCrCIR03F09*	F : CGTCCATCTAAGTGACC R : TTTAACCTTCAGTAGAAACC	55	158	176	158/176
mCrCIR04H06*	F : GGACATAGTGAGAAGTTGG R : CAAAGTGGTGAAACCTG	55	202	208/214	202/208/214
mCrCIR05A05* ^b	F : ATACCTGTGAGCGTGAG R : CCTCTTCCCTTCCATT	55	146/165	156/160	146/156/160/165
mCrCIR05D11*	F : TCAACATTCTTACCAGA R : ATCATTTCTCACTGCACC	55	268	248	248/268
mCrCIR06B05	[19]	55	0	222/244	222/244
mCrCIR07B05	[19]	50	216	222/266	216/222/266
mCrCIR07D07	[19]	55	216	222	216/222
mCrCIR07E05 ^b	[19]	50	146/148	136/138	136/138/146/148
mCrCIR07G11	[19]	50	214/220	220/226	214/220/226
MEST0010	[20]	55	178	168/170	168/170/178
MEST0817	[20]	55	146	172/196	242/252/254

Ta, annealing temperature.

Table 2. Chloroplastic and mitochondrial parental origins of the allotetraploid FLHORAG1. Three SSR markers (ccmp3, ccmp6' and NTCP9') were used for chloroplastic analysis and three PCR markers (*nad7/1-2* and *nad5/2-1*) were used for mitochondrial analysis. Numbers in the table correspond to the PCR product size obtained for each genotype.

Genotypes	SSRs chloroplastic markers			Mitochondrial markers	
	ccmp3	ccmp6'	NTCP9'	<i>nad7/1-2</i>	<i>nad5/2-1</i>
Willow leaf	104	127	255	152	220
mandarin					
Trifoliate	103	139	254	132	210
orange					
FLHORAG1	103	139	254	152	220

Table 3. Growth rate, leaf greenness, leaf thickness, leaf surface area and stomatal size of diploids and tetraploids of trifoliate orange and Willow leaf mandarin and their allotetraploid, FLHORAG1. Values (mean value \pm SE) with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

	Trifoliate orange		Willow leaf mandarin		FLHORAG1
	diploid	tetraploid	diploid	tetraploid	tetraploid
Growth rate (cm.day ⁻¹)	0.32 / 0.99	0.20 / 0.97	0.15 / 0.99	0.11 / 0.98	0.24 / 0.99
Slope value / r ²	a	c	d	e	b
Leaf Greenness	55.2 \pm 0.7	63.1 \pm 0.6	34.2 \pm 0.6	54.2 \pm 1.3	62.8 \pm 0.9
(SPAD unit)	b	a	c	b	a
Leaf thickness	273 \pm 7	341 \pm 10	267 \pm 9	310 \pm 13	339 \pm 9
(μ m)	b	a	b	a	a
Leaf area	1035.6 \pm 39.7	1102.9 \pm 50.9	802.4 \pm 76.1	701.2 \pm 48.9	1148.3 \pm 58.4
(mm ²)	a	a	b	b	a
Stomata size	384 \pm 13	583 \pm 20	295 \pm 11	540 \pm 23	584 \pm 18
(length \times width, μ m ⁻²)	b	a	c	a	a
Stomata density	487 \pm 34	307 \pm 23	395 \pm 31	290 \pm 16	282 \pm 14
(length \times width, μ m ⁻²)	a	c	b	c	c

Table 4. Molecular characterization of contrasted transcript derived fragments (TDFs) obtained by cDNA-AFLP. TO: Trifoliate orange, WLM: Willow Leaf Mandarin, 2X: diploid, 4X: tetraploid, C: control conditions, S salt stress conditions.

TDFs	cDNA-AFLP patterns ^a										Corresponding protein	E value ^b	General sequence similarity ^c	Accession number	Citrus sequence similarity ^d
	TO2X		TO4X		WLM2X		WLM4X		FLHORAG1						
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S					
1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Protein arginine N-methyltransferase protein	1.e ⁻⁶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_100365	<i>Poncirus trifoliata</i>
2	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	Choline monooxygenase	2.e ⁻⁷	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_119135	<i>Citrus sinensis</i>
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Group 5 late embryogenesis abundant protein	6.e ⁻³³	<i>Citrus unshiu</i>	DQ424891	<i>Citrus unshiu</i>
4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Kelch repeat-containing Serine/threonine phosphoesterase	1.e ⁻¹¹¹	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT2G27210	<i>Citrus reticulata</i>
5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Serine/threonine kinase	1.e ⁻⁵	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_102350	-
6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Putative mitochondrial processing peptidase beta subunit	2.e ⁻⁶³	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AK226251	<i>Poncirus trifoliata</i>
7	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Amino acid permease 1 (amino acid transporter)	4.e ⁻⁴⁸	<i>Nicotiana sylvestris</i>	AT5G41800	<i>Citrus sinensis</i>
8	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	65 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A	8.e ⁻²¹	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_113479	<i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>
9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Inorganic pyrophosphorylase 1	3.e ⁻⁴²	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_099987	<i>Citrus sinensis</i>
10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Zinc finger protein (C3HC4-type Ring finger)	2.e ⁻¹⁰	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_125268	<i>Citrus x paradisi</i>
11	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	5'-AMP-activated protein kinase beta-1 subunit-related	2.e ⁻³⁹	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_123342	<i>Citrus sinensis</i>
12	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	23kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II	2.e ⁻¹⁴	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G06680	<i>Poncirus trifoliata</i>
13	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Unannotated protein	5.e ⁻⁸⁸	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT5G45410	<i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>

^a, + Transcript present; - Transcript absent; ^b, Similarity was significant for E values < 1.e⁻⁵; ^c, Similarity was checked using the BLAST program of NCBI; ^d, Similarity was checked using the BLAST program on citrus database (high similarity, E values = 0)

Legends of figures

Figure 1: Chromosome number of the allotetraploid FLHORAG1. In the picture, 36 chromosomes can clearly be seen.

Figure 2: Leaf sodium and chloride contents (mg/g dry weight) of diploids and autotetraploids of trifoliate orange (A & D), Willow leaf mandarin (B & E) and their allotetraploid FLHORAG1 (C & F). (●: diploid / control condition ; ○: diploid / stress condition ; ▼: tetraploid / control condition ; ▽: tetraploid / stress condition). Vertical bars indicate the mean value ($n=3$) \pm SE. For each type of ion, a statistical test was performed for values of the 56th day. Data with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Figure 3: Principal coordinates analysis (PCoA) performed in order to analyse the structuration of the expression pattern variability of TDFs. A) First and second axes of the PCoA, X axis allows discriminating genotypes depending their allelic constitution and represented 67% of the total variability. Y axis allows discriminating genotypes when subjected to control and salt stress treatment and represented 13% of the total variability. B) Second and third axes of the PCoA, Z axis allows discriminating genotypes depending of the ploidy status and represented only 6% of the total variability. TO: Trifoliate Orange, WL: Willow leaf mandarin. 2X : diploid, 4X: tetraploid.

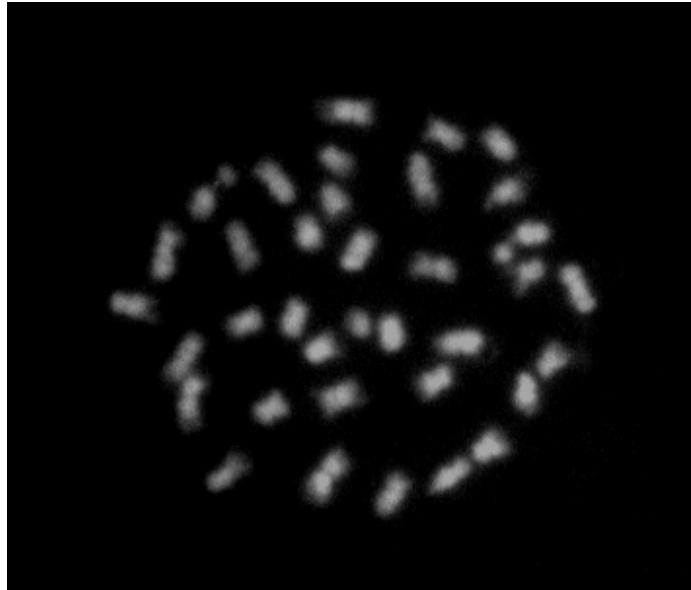


Fig. 1

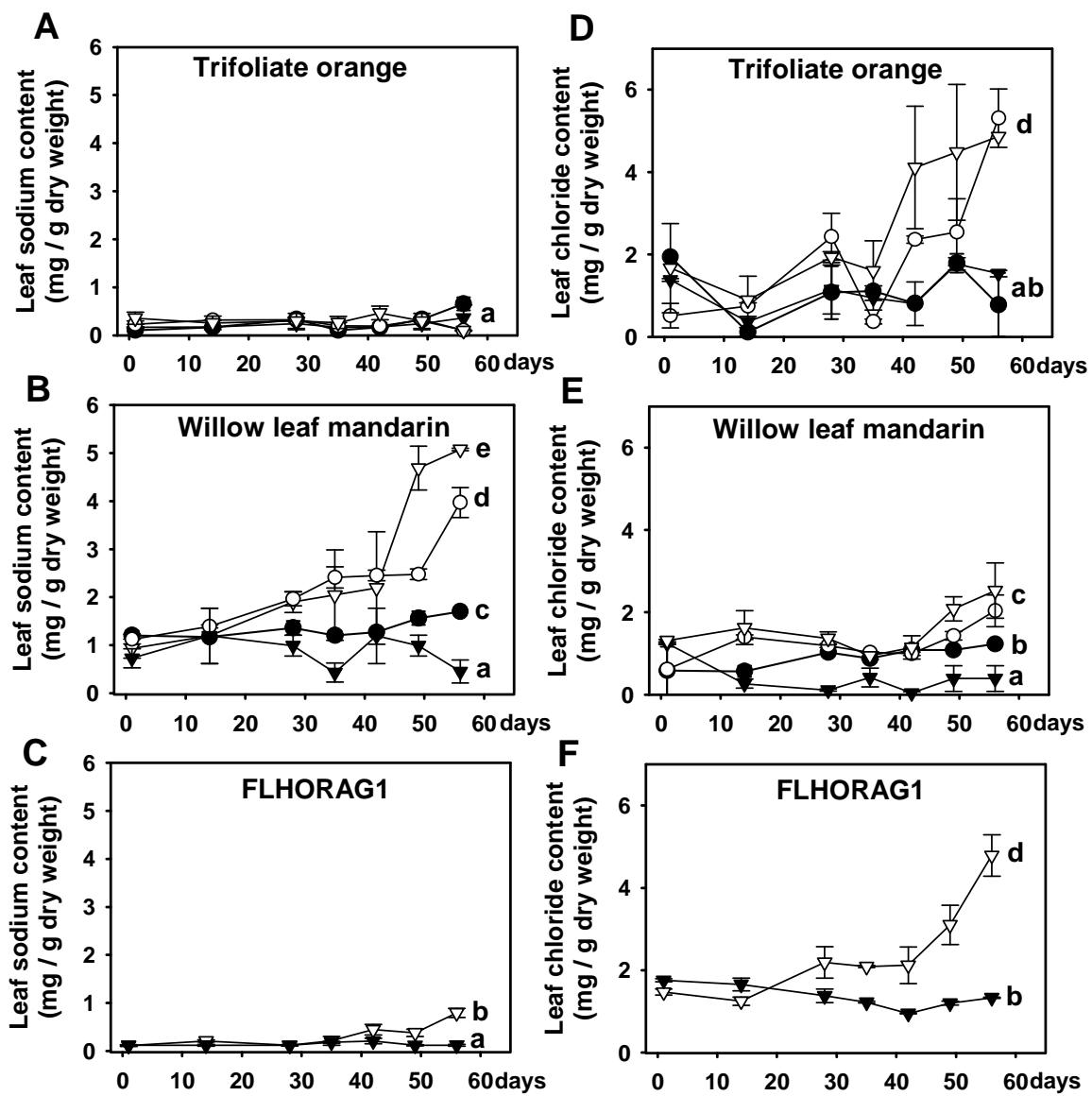


Fig. 2

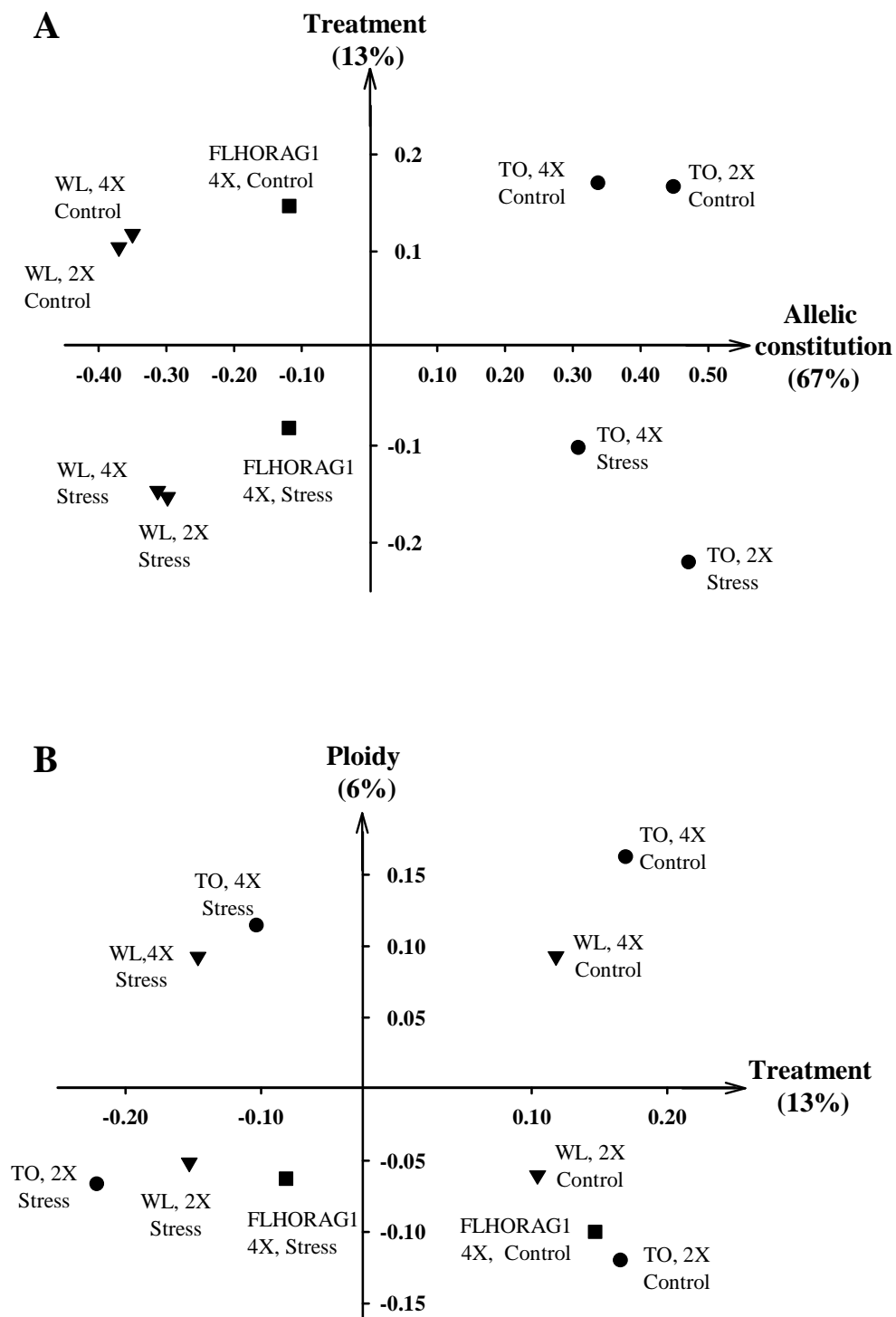


Fig. 3

PHYSIOLOGIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF TOLERANCE TO SALT STRESS AND WATER DEFICIT OF AUTOTETRAPLOID CITRUS ROOTSTOCKS

ABSTRACT: Today, the sustainability of the citrus industry is threatened by the effects of global warming in many geographical semi-arid areas. Many intra-and interspecific crosses between *Poncirus*, *Fortunella* and *Citrus* genera allowed developing new rootstock (RT) increasingly resistant to these new constraints. Citrus spontaneously generate embryos through partial apomixis that are autotetraploids (4X). Does the use of 4X plants as RT be an alternative to the use of RT designed through breeding? 4X genotypes were shown to be more tolerant to salt stress than their diploids (2X). However, the higher tolerance of 4X vs 2X plants has demonstrated to be dependent on water availability. Rangpur lime (RL), a RT known for its tolerance to water deficit, was chosen as the experimental model plant. 4XRL has a specific morphology and anatomy that could make it more tolerant to abiotic stresses than 2XRL. Transcriptome analysis by DNA microarray and qRT-PCR on leaves has revealed little change in gene expression between 4XRL and 2XRL, suggesting that their phenotypic differences could be more the result of a gene dosage compensation than epigenetic modifications. Stomatal conductance (g_s) was lower for 4XRL than for 2XRL, as well for varieties grafted on 4XRL compared to those grafted on 2XRL. Transcriptome studies of the Valencia delta orange grafted on 4XRL and 2XRL revealed many genes involved in water deficit tolerance which were constitutively overexpressed in 4XRL roots. As well, 4XRL RT was more tolerant to water deficit than 2XRL. Abscissic acid contents measured in leaves of the scion and in 4XRL roots were higher than for 2XRL in control condition, which may explain the lower g_s values observed in plants grafted on 4XRL. Decreasing in g_s of varieties grafted on 4XRL, by limiting the transpiration stream, could limit water absorption and save water from the substrate when occurs a prolonged drought.

KEYWORDS: Citrus, Autotetraploid, Rootstock, Water deficit, Salt stress, Physiology, Microarrays, qRT-PCR, Transcriptome.